1993177

SYMBOLAE BOTANICAE UPSALIENSES VIII:2
ARBETEN FRÅN BOTANISKA INSTITUTIONERNA I UPPSALA
UTGIVNA AV PROF. E. MELIN OCH PROF. J. A. NANNFELDT

ÜBER DIE PHYSIOLOGIE LIGNINABBAUENDER BODEN-HYMENOMYZETEN

STUDIEN AN SCHWEDISCHEN MARASMIUS-ARTEN

VON

GÖSTA LINDEBERG

UPPSALA
A.-B. LUNDEQUISTSKA BOKHANDELN
(I DISTRIBUTION)

SYMBOLAE BOTANICAE UPSALIENSES

Under denna titel utgivas originalarbeten från Uppsala Universitets institutioner för fysiologisk och för systematisk botanik. Avhandlingarna publiceras utan jämna tidsintervall och utdelas till bibliotek, lärda sällskap, vetenskapliga institutioner, botaniska museer och trädgårdar i utbyte mot botaniska publikationer. De äro även till salu i bokhandeln *(A.-B. Lundequistska Bokhandeln, Uppsala)* för å varje avhandling utsatt pris.

Korrespondens och publikationer böra adresseras till *Professor E. Melin,* Institutionen för fysiologisk botanik, Uppsala.

Die in unregelmässigen Intervallen veröffentlichten *Symbolae Botanicae Upsalienses* enthalten Originalarbeiten aus den Instituten für physiologische und für systematische Botanik der Universität Uppsala. Sie werden Bibliotheken, gelehrten Gesellschaften, Instituten, botanischen Museen und Gärten im Austausch gegen botanische Publikationen zugesandt. Sie sind auch im Buchhandel *(A.-B. Lundequistska Bokhandeln, Uppsala, Schweden)* zu den auf jeder Abhandlung angegebenen Preisen erhältlich.

Korrespondenzen und Publikationen erbitten wir uns unter folgender Adresse: *Professor Dr. E. Melin,* Institut für physiologische Botanik der Universität, Uppsala, Schweden.

The *Symbolae Botanicae Upsalienses,* published at irregular intervals, include original memoirs from the Institutes of Physiological and Systematic Botany of the University of Uppsala. They are mailed to libraries, learned societies, botanical institutes, museums and gardens in exchange for botanical publications. They are also sold *(A.-B. Lundequistska Bokhandeln, Uppsala, Sweden)* at prices quoted on every paper.

Correspondence and publications should be addressed as follows: *Professor Dr. E. Melin,* Institute of Physiological Botany of the University, Uppsala, Sweden.

Les *Symbolae Botanicae Upsalienses,* publiées à intervalles irréguliers, comprennent des mémoires des Instituts de Botanique Physiologique et de Systématique de l'Université d'Uppsala. Elles sont distribuées aux bibliothèques, sociétés savantes, instituts, musées et jardins botaniques en échange de publications botaniques. Elles sont aussi en vente *(A.-B. Lundequistska Bokhandeln, Uppsala, Suède)* aux prix indiqués sur chaque mémoire.

La correspondance et les envois de publications doivent être adressés comme suit: *Professor Dr. E. Melin,* Institut de Botanique Physiologique de l'Université, Uppsala, Suède.

ÜBER DIE PHYSIOLOGIE LIGNINABBAUENDER BODEN-HYMENOMYZETEN

STUDIEN AN SCHWEDISCHEN MARASMIUS-ARTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE MIT GENEHMIGUNG DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN SEKTION DER WEITBERÜHMTEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT ZU UPPSALA ZUR ÖFFENTLICHEN BEURTEILUNG VORGELEGT

VON

GÖSTA LINDEBERG
FIL. LIC., V.-D.

DIE VERTEIDIGUNG WIRD AM 11. MÄRZ 1944 UM 10 UHR VORMITTAGS IM BOTANISCHEN HÖRSAALE STATTFINDEN

UPPSALA 1944
ALMQVIST & WIKSELLS BOKTRYCKERI AB

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548007_0036

SYMBOLAE BOTANICAE UPSALIENSES VIII:2
ARBETEN FRÅN BOTANISKA INSTITUTIONERNA I UPPSALA
UTGIVNA AV PROF. E. MELIN OCH PROF. J. A. NANNFELDT

ÜBER DIE PHYSIOLOGIE LIGNINABBAUENDER BODEN-HYMENOMYZETEN

STUDIEN AN SCHWEDISCHEN MARASMIUS-ARTEN

VON

GÖSTA LINDEBERG

UPPSALA
A.-B. LUNDEQUISTSKA BOKHANDELN
(I DISTRIBUTION)

UPPSALA 1944
ALMQVIST & WIKSELLS BOKTRYCKERI AB
43761

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung 5
I. Das Untersuchungsmaterial 9
A. Einsammlung und Reinzüchtung der Pilze 9
B. Aussehen der Kulturen 12
II. Experimentelle Untersuchungen über Streuzersetzung durch verschiedene *Marasmius*-Arten 14
A. Ausführung der Versuche 16
B. Analysenmethoden 18
C. Der Einfluss der Pilzmyzelien auf die Analysenresultate 30
D. Ergebnisse 31
III. Experimentelle Untersuchungen über die Bedingungen für das Wachstum der *Marasmius*-Arten in synthetischen Nährlösungen 40
A. Methodik 40
B. Das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen 42
C. Der Einfluss von Wuchsstoffen 46
1. Der Einfluss von Aneurin, Biotin und Inosit in Überschuss 49
2. Aneurin als wachstumsbegrenzender Faktor 69
a. Methodisches 69
b. Versuche 72
c. Die Aneurinheterotrophie der verschiedenen Arten 85
3. Biotin als wachstumsbegrenzender Faktor bei *Marasmius androsaceus* 87
a. Versuche 88
b. Besprechung der Versuchsergebnisse 100
D. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration 104
E. Der Einfluss von Kalzium, Mangan und Zink 116
1. Der Einfluss der Mineralbestandteile in Streuextrakten 117
2. Der Einfluss von Kalzium und Mangan 120
a. Vorversuch 124
b. Die Wirkung von Kalzium und Mangan in verschiedenen Konzentrationen 125
c. Die Wirkungsweise des Kalziums 132
Die Abhängigkeit der Kalziumwirkung von der Magnesiumsulfatkonzentration 133
Die Abhängigkeit der Kalziumwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration 136
Die Abhängigkeit der Kalziumwirkung von der Ammoniumtartratkonzentration 147
d. Kann Kalzium durch Strontium ersetzt werden? 148
e. Zusammenfassung und Besprechung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Kalziumwirkung 149

Seite

3. Der Einfluss von Zink 151
a. Der Einfluss von Zink in Überschuss 152
b. Zink als wachstumsbegrenzender Faktor 155
c. Die Abhängigkeit der Hemmungswirkung höherer Zinkkonzentrationen von der Wasserstoffionenkonzentration 162
d. Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Zinkwirkung 166
IV. Ökologische Gesichtspunkte 167
Summary 170
Literaturverzeichnis 173

Einleitung.

Seit langem nimmt man allgemein an, dass die auf Streu wachsenden Hymenomyzeten eine wichtige Rolle bei den Stoffumwandlungen im Waldboden spielen. Im Vergleich beispielsweise mit den mykorrhizabildenden oder den holzzersetzenden Hymenomyzeten sind indes diese Pilze in sehr geringem Umfang Gegenstand physiologischer und ökologischer Untersuchungen gewesen.

Die vorliegende Arbeit soll ein Beitrag zur Kenntnis der Ernährungsphysiologie dieser Pilze sein. Erweitertes Wissen auf diesem Gebiet, erworben durch experimentelle Untersuchungen, ist auch in vielen Beziehungen eine Voraussetzung für das Verständnis der Ökologie dieser Organismen.

Als Versuchsobjekte wurden verschiedene Arten der Gattung *Marasmius* gewählt. Diese Gattung ist ihrer allgemeinen Verbreitung nach hauptsächlich tropisch. Sie umfasst indes in Schweden gegen 30 Arten, von denen mehrere zu den allgemeinsten und typischsten Streupilzen unserer Nadel- und Laubwälder gehören.

Viele dieser Arten sind dadurch gekennzeichnet, dass sie an spezifische Streuarten gebunden sind. Man muss es von vornherein für möglich halten, dass diese Spezialisierung auf besondere physiologische Eigenschaften zurückgeführt werden kann.

Nach Beschreibung des Untersuchungsmaterials in Kap. I werden in Kap. II die Resultate einer Untersuchung über die Fähigkeit der verschiedenen Arten vorgelegt, unter kontrollierten Verhältnissen Streu zu zersetzen. Die Absicht war vor allem, festzustellen, inwieweit die Pilze imstande sind, die widerstandsfähigsten Komponenten des Streumaterials, Lignin und Zellulose, abzubauen. Es ist von besonderer Bedeutung, dass sämtliche Arten ein mehr oder minder grosses Vermögen gezeigt haben, Lignin abzubauen. Als Repräsentanten der ligninzersetzenden Bodenhymenomyzeten verdienen diese Pilze auch vom praktischen Gesichtspunkt Interesse.

In Kap. III werden die Bedingungen für das Wachstum der Pilze in definierten synthetischen Nährlösungen behandelt.

Die fraglichen *Marasmius*-Arten waren bisher nicht Gegenstand ernährungsphysiologischer Untersuchungen. Deshalb war es notwendig, vom Beginn der Arbeit an gleichzeitig mehrere Probleme zu behandeln. Je grössere Kenntnis von der Abhängigkeit der Pilze von verschiedenen Faktoren gewonnen wurde, um so mehr konnten die Nährlösungen verbessert und um so sorgfältiger konnten die Anforderungen der einzelnen Arten an die Zusammensetzung des Mediums berücksichtigt werden. Hierdurch wurden immer bessere Voraussetzungen für das Studium des Einflusses bestimmter Faktoren auf das Wachstum geschaffen. Ein grosser Teil der früheren, mehr orientierenden Untersuchungen konnte in der folgenden Darstellung fortgelassen werden.

Es zeigte sich bald, dass die Pilze, um eine synthetische Nährlösung assimilieren zu können, einen Zusatz gewisser, in chemisch reiner Form zugänglicher Wuchsstoffe fordern. Ihr Bedarf an solchen Stoffen wurde zum Gegenstand einer ziemlich umfassenden Untersuchung gemacht, wobei das Hauptgewicht auf das Studium der quantitativen Wirkung der Wuchsstoffe gelegt wurde.

Es stellte sich heraus, dass die Wasserstoffionenkonzentration des Mediums in wesentlicher Weise das Wachstum der Pilze beeinflusst, und die Abhängigkeit der letzteren von diesem Faktor wurde auch eingehender studiert.

Endlich ergab das Studium der Wirkung von Streuextrakten auf die Pilze, dass ihr Wachstum stark durch gewisse Mineralbestandteile solcher Extrakte beeinflusst wird. Dies führte zu einer Untersuchung des Bedarfs der verschiedenen Arten an einigen, bei sehr schwachen Konzentrationen wirksamen Metallen.

*

Die vorliegende Arbeit wurde im Jahre 1937 am Botanischen Institut in Uppsala begonnen. Der grössere Teil der hier veröffentlichten Untersuchungen wurde in den Jahren 1941 und 1942 in dem neuerbauten Institut der Universität Uppsala für physiologische Botanik ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, dem Begründer und Vorsteher des Instituts für physiologische Botanik in Uppsala, Herrn Prof. Dr. Elias Melin, der mir die erste Anregung zu diesen Forschungen gab, spreche ich bei dieser Gelegenheit meinen wärmsten Dank aus für eine grundlegende pflanzenphysiologische und mikrobiologische Schulung, für das lebhafte Interesse, mit dem er meine Arbeit stets verfolgt und unterstützt hat, sowie für das grosse persönliche Wohlwollen, das er mir vom Beginn meiner botanischen Studien an zuteil werden liess. Ausserdem danke ich ihm und

Herrn Prof. Dr. J. A. Nannfeldt für die Aufnahme meiner Abhandlung in die *Symbolae Botanicae Upsalienses*.

Auch meinen übrigen akademischen Lehrern sage ich meinen herzlichen Dank. Dabei wende ich mich in erster Linie an meine Lehrer in der Botanik, die Herren Prof. Dr. N. E. Svedelius, Prof. Dr. R. Sernander und Prof. Dr. G. E. Du Rietz. Für sehr wertvollen naturwissenschaftlichen Unterricht spreche ich auch Herrn Prof. Dr. N. v. Hofsten meinen ergebensten Dank aus.

Die analytischen Arbeiten im Zusammenhang mit den Untersuchungen über die Streuzersetzung wurden am Mikrobiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule ausgeführt. Dem früheren und dem jetzigen Vorsteher dieses Instituts, den Herren Prof. Dr. Chr. Barthel und Prof. Dr. R. Nilsson, bin ich für freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes zu Dank verpflichtet.

Für wertvolle Ratschläge hinsichtlich der chemischen Bestimmungen von Lignin danke ich Herrn Prof. Dr. B. Holmberg, für Einführung in verschiedene Analysenmethoden Herrn Fil. lic. N. Bengtsson.

Herrn Fil. Dr. S. Lundell bin ich für Hilfe bei der Sammlung und Bestimmung des Untersuchungsmaterials viel Dank schuldig.

In grosser Dankesschuld stehe ich auch zu meiner Frau, Fil. mag. Brita Lindeberg, die mir bei zahlreichen Gelegenheiten wertvolle Hilfe im Laboratorium geleistet und mich bei Ausführung dieser Arbeit in aufopfernder Weise unterstützt hat.

Meinen Kollegen am Institut für physiologische Botanik danke ich für anregende Besprechungen und gute Kameradschaft. Besonderen Dank schulde ich meinem Freunde Fil. lic. T. Wikén, der meine Abhandlung im Manuskript gelesen und mir dabei viele gute Ratschläge erteilt hat. Ein herzliches Wort des Dankes richte ich auch an Frau Fil. lic. Birgitta Norkrans, welche während meiner Einberufung zum Militärdienst die Pflege meiner Stammkulturen und die Fortführung der in Gang befindlichen Experimente übernommen hat.

Frl. Fil. stud. Karin Hagström danke ich für gediegene Hilfe bei den analytischen Arbeiten.

Die Übertragung ins Deutsche wurde mit Interesse und Sorgfalt von Herrn Dr. K. Flex ausgeführt.

Für das gewissenhafte Zeichnen der Diagramme sage ich Frl. Birgitta Wedberg meinen Dank.

Von verschiedenen Fonds erhielt ich wirtschaftliche Unterstützung für meine Arbeit. „Fonden för skogsvetenskaplig forskning“ bestritt die Kosten der Untersuchungen über den Streuabbau. Von „Lektor A. G. Eliassons fond för mykologisk forskning“ bekam ich zwei Beiträge.

„Stiftelsen Lars Hiertas minne“ bewilligte mir einen Zuschuss für die Druckkosten. Endlich wurden meine Studien wesentlich durch Stipendien von Västmanlands-Dala Nation in Uppsala erleichtert. Für alle diese Hilfe spreche ich meinen aufrichtigen Dank aus.

Uppsala, Institut für physiologische Botanik, Februar 1944.

Gösta Lindeberg.

I. Das Untersuchungsmaterial.

A. Einsammlung und Reinzüchtung der Pilze.

Um Reinkulturen von Hutpilzen zu erhalten, kann man bekanntlich zwei verschiedene Methoden anwenden: Erstens kann man Sporen auf geeignetem Substrat zum Keimen bringen, worauf man Einspormyzelien isoliert. Durch Kombination solcher Myzelien kann man dann Diploidmyzelien bekommen (Kniep 1928 u. a.). Zweitens kann man Diploidmyzelien direkt in Reinkultur gewinnen, indem man Gewebestücke von Fruchtkörpern züchtet (Brefeld 1877, S. 80; 1908, S. 49; Duggar 1905).

Ausführliche Untersuchungen über die Sporenkeimung der *Marasmius*-Arten habe ich nicht vorgenommen. Bei folgenden Arten konnte ich indes feststellen, dass die Sporen in Malzagar (2,5 % Malzextrakt, 1,5 % Agar) keimten und dass sich entwicklungsfähige Einspormyzelien bildeten: *M. alliaceus*, *M. androsaceus*, *M. foetidus*, *M. fulvobulbillosus*, *M. oreades*, *M. peronatus*, *M. putillus*, *M. ramealis* und *M. scorodonius*.

Bei gewissen der eben erwähnten Pilze sowie bei *M. graminum*, *M. perforans* und *M. rotula* wurde Sporenkeimung schon in dem Kondenswasser beobachtet, das sich gewöhnlich um die Sporen bildet, wenn diese in Petrischalen gesammelt werden. Fries (1943 b) hat auch kürzlich nachgewiesen, dass die Sporenkeimung bei *M. perforans* sehr rasch erfolgt. Wiederholte Versuche zeigten indes, dass entwicklungsfähige Einspormyzelien von *M. perforans* und *M. rotula* in Malzagar nicht auswuchsen. Es scheint deshalb, dass Malzagar hemmend auf das Wachstum der jungen Einspormyzelien dieser Arten wirkt.

In den meisten Fällen isolierte ich die als Versuchsobjekte verwendeten Diploidmyzelien durch Gewebekulturen. Durch dieses Verfahren vergewisserte ich mich, dass mein biologisches Material wirklich Stämme repräsentierte, die sich in der Natur als konkurrenzfähig erwiesen hatten. Nur wenn sich dieses Verfahren nicht anwenden liess, z. B. wenn die Fruchtkörper stark durch Bakterien verunreinigt waren, bediente ich mich der bedeutend zeitraubenderen Methode, Einspormyzelien zu isolieren und danach verschiedene solche Myzelien zu kombinieren, um Diploidmyzelien zu erhalten.

Tabelle 1.

Das Untersuchungsmaterial.

Marasmius-Art	Stamm	Fundort[1]	Fundzeit	Vorkommen
M. alliaceus Fr.	A[3]	Hägnen, Femsjö, Småland. Buchenwald.	16/8 37	Auf vermodernden Buchenästen.
M. androsaceus Fr.	A	Norby, Bondkyrka. Nadelmischwald.	8/2 37	Auf abgefallenen Kiefernnadeln.
	B	Ekeby, Bondkyrka. Nadelmischwald.	28/8 38	desgl.
	C	Gottsunda, Bondkyrka. Nadelmischwald.	11/9 39	desgl.
	D	„Fiby urskog", Vänge. Kiefernwald.	22/9 39	desgl.
	E	Håga, Bondkyrka. Nadelmischwald.	30/8 40	desgl.
M. chordalis Fr.	A[3]	Österby, Haga. Nadelmischwald.	2/10 38	Zwischen Moosen und Gräsern.
M. epiphyllus Fr.	A	„Stabby backe", Bondkyrka.	21/9 38	Auf vermoderndem Espenlaub.
M. foetidus Fr.	A	Vårdsätra, Bondkyrka. Laubwald.	20/8 37	Auf vermodernden Eschenästen.
	B	desgl.	1/9 40	desgl.
M. fulvobulbillosus O. R. Fr.	A[2]	„Stabby backe", Bondkyrka.	8/10 37	Zwischen Moosen und Gräsern unter Fichten.
	B	desgl.	5/9 38	desgl.
	C	desgl.	5/9 41	desgl.
M. graminum Berk. & Br.	A[4]	„Naturparken", Stora Änggården, Göteborg.	7/8 37	Auf *Agropyron repens*.
M. oreades Fr.	A	„Slottsbacken", Uppsala.	10/6 37	In einem Rasen.
	B	desgl.	29/8 40	desgl.
M. perforans Fr.	A, B, C	Nåsten, nahe Håga, Bondkyrka. Nadelmischwald.	11/6 37	Auf abgefallenen Fichtennadeln.
	D, E	Norby, Bondkyrka. Nadelmischwald.	9/9 38	desgl.
	F, G	Ekeby, Börje. Nadelmischwald.	1/10 38	desgl.
	H	Norby, Bondkyrka. Nadelmischwald.	5/9 40	desgl.
M. peronatus Fr.	A	„Kronåsen", Uppsala. Kiefernwald.	8/7 37	Zwischen Nadeln und Gräsern unter Kiefern.

Marasmius-Art	Stamm	Fundort[1]	Fundzeit	Vorkommen
M. peronatus Fr.	B	wie Stamm A.	28/8 40	wie Stamm A.
M. putillus Fr.	A[2 3]	Långebrolid, Femsjö, Småland. Nadelmischwald.	20/9 40	Auf abgefallenen Kiefernnadeln.
M. ramealis Fr.	A	Säby, Danmark. Nadelmischwald.	7/2 37	Auf Wacholderästen.
	B	Selknä, Funbo. Nadelmischwald.	22/9 40	desgl.
	C	Norby, Bondkyrka. Nadelmischwald.	10/10 41	desgl.
M. rotula Fr.	A[5]	Åsen, Älvdalen, Dalarna. Laubwald.	3/7 37	Auf abgefallenen Blättern und Zweigen.
	B	Vilan, Danmark. Fichtenwald.	1/9 40	Auf abgefallenen Fichtennadeln.
	C	„Prästgårdsskogen", Roslagsbro. Fichtenwald.	14/9 41	desgl.
M. scorodonius Fr.	A	Sunnersta, Bondkyrka. Nadelmischwald.	11/8 37	Zwischen Nadeln und Rindenstückchen von Fichten.
	B	Håga, Bondkyrka. Nadelmischwald.	5/9 41	desgl.

[1] Wo nichts anderes angegeben ist, liegen die Fundorte der Pilze in Uppland.
[2] Aus Sporen reingezüchtet.
[3] Von Fil. Dr. S. LUNDELL gesammelt.
[4] Von Gartendirektor T. NATHORST-WINDAHL gesammelt.
[5] Von Fil. Dr. D. LIHNELL gesammelt.

Bei den grösseren *Marasmius*-Arten konnten Gewebestücke aseptisch aus dem Inneren des Stieles genommen und direkt auf Malzagar gezüchtet werden. Viele *Marasmius*-Arten haben indes zu kleine Fruchtkörper, als dass man Gewebestücke steril aus ihnen entnehmen könnte. In solchen Fällen wurde folgendes Verfahren angewandt (vgl. MELIN 1936, S. 1058): Stiele junger Fruchtkörper wurden in fliessendem Wasser reingespült, darauf 2—3 Sekunden in 0,1 %ige Sublimatlösung gelegt und schliesslich dreimal in sterilem Wasser gewaschen. Danach wurden sie in sterile Petrischalen gelegt und mit einem sterilen Skalpell in kleinere Stücke geschnitten, die in Petrischalen mit Malzagar gebracht wurden. Von den Stücken, welche aseptisch blieben, konnten die auswachsenden Myzelien nach einiger Zeit in Röhrchen mit Malzagar überführt werden. Nachdem das Aussehen und die Reinheit der isolierten Myzelien unter dem Mikroskop kontrolliert worden war, wurden sie als Stammkulturen für die experimentellen Untersuchungen benutzt. Die Stammkulturen wurden einmal im Monat umgeimpft.

Tab. 1 enthält eine Übersicht über die Arten und Stämme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sowie wichtigere Angaben über ihr Einsammeln. Wo nichts anderes angegeben ist, wurden die Pilze durch Gewebekulturen reingezüchtet.[1]

B. Aussehen der Kulturen.

Die Diploidmyzelien der untersuchten *Marasmius*-Arten sind sämtlich schnallentragend.

In bezug auf Myzelfarbe, Entwicklung von Luftmyzel, Veränderungen des alternden Myzels usw. weisen die einzelnen Arten gewisse charakteristische Verschiedenheiten auf. Die Zusammensetzung des Substrats und die Lichtversorgung haben indes grossen Einfluss auf diese Erscheinungen. Die Beobachtungen, welche in aller Kürze im folgenden erwähnt werden, wurden an Myzelien gemacht, die auf Malzagar gezüchtet und im Dunklen aufbewahrt wurden.

Die Myzelfarbe ist bei *M. foetidus* und *M. putillus* hell graugelb. Auch das Myzel von *M. peronatus* hat einen schwach gelblichen Farbenton. Die übrigen Arten haben weisse Myzelien.

Die Entwicklung von Luftmyzel ist bei den einzelnen Arten sehr verschieden. *M. foetidus* und *M. putillus* bilden nur wenig Luftmyzel, und auch bei *M. peronatus* ist die Luftmyzelentwicklung ziemlich schwach. Bei den übrigen Arten ist das Luftmyzel dagegen gut ausgebildet. *M. epiphyllus* und *M. oreades* sind durch besonders üppige Entwicklung des Luftmyzels gekennzeichnet.

Wenn das Myzel altert, zeigt es bei mehreren Arten charakteristische Veränderungen hinsichtlich der Struktur, der Farbstoffbildung usw.

Das anfangs weisse Myzel von *M. ramealis* nimmt allmählich einen braungelben Farbenton an. Bei *M. chordalis* bilden die Hyphen einen dunkelbraunen Farbstoff, der reichlich an gewissen Stellen des älteren Myzels abgesondert wird.

Bei einigen Arten weist auch das Luftmyzel in älterem Stadium charakteristische Strukturveränderungen auf. Die Lufthyphen bilden membranartige Gewebe, welche für die verschiedenen Arten charakteristische Farben annehmen. Solche Membranbildung findet sich bei *M. alliaceus*, *M. androsaceus*, *M. fulvobulbillosus*, *M. rotula* und *M. scorodonius* sowie in geringerem Umfang bei *M. perforans* und *M. ramealis*. Die Tendenz zur Bildung von Membranen ist jedoch bei verschiedenen Stämmen ein und derselben Art sehr ungleich.

[1] In der folgenden Darstellung sind die Bezeichnungen (A, B, C usw.) der Stämme nur angegeben, wenn mehr als ein Stamm derselben Art isoliert wurde.

Die Farbe der Membranen ist etwas von ihrem Alter abhängig. Bei einigen der Arten wird sie mit der Zeit dunkler. Bei *M. ramealis* ist sie dunkelbraun, bei *M. alliaceus* und *M. perforans* schwarzbraun, bei *M. androsaceus* violettbraun bis schwarz und bei *M. scorodonius* rotbraun bis dunkelbraun oder schwarzbraun. *M. fulvobulbillosus* bildet rotbraune und *M. rotula* hell lachsrote Membranen.

Ein Teil der von den Myzelien gebildeten Farbstoffe zeigt grosse Ähnlichkeit mit gewissen Farbstoffen, die bei den Fruchtkörpern der betreffenden Arten in der Natur vorkommen. Dies gilt von dem rotbraunen Farbstoff bei *M. chordalis* und von den dunklen Membranfarbstoffen bei *M. alliaceus*, *M. androsaceus*, *M. perforans* und *M. scorodonius*. Die lachsrote Membranfarbe bei *M. rotula* kommt dagegen nicht bei den Fruchtkörpern des Pilzes in der Natur vor.

Die Beziehung der Membranbildung zur Fruchtkörperbildung wurde nicht näher untersucht. Indes will ich einige einzelne Beobachtungen erwähnen: Bei einer Art, *M. scorodonius*, werden oft in einer gefärbten Hyphenmembran wirkliche Fruchtkörper angelegt, die allmählich zu einer Höhe von mehreren Zentimetern auswachsen. Der Stiel nimmt bei diesen Fruchtkörpern dasselbe Aussehen an wie bei normalen, in der Natur wachsenden Fruchtkörpern der Art. Die Hüte setzen sich deutlich vom Stiel ab, bleiben aber verkümmert, kaum grösser als ein Stecknadelkopf.

Bei ein paar andern Arten werden von den gefärbten Membranen Hyphenstränge von rhizomorpha-artiger Natur gebildet. So kommen bei *M. androsaceus* schwarze, verzweigte Hyphenstränge vor, die ganz den Rhizomorphen gleichen, welche für diese Art in der Natur charakteristisch sind. Diese sind unter dem Namen *Rhizomorpha setiformis* Roth. beschrieben und als sterile Fruchtkörper aufgefasst worden (Ricken 1910/15). Bei *M. fulvobulbillosus* bilden sich in derselben Weise verzweigte Hyphenstränge, die jedoch etwas dünner sind als bei *M. androsaceus* und hell braunrote Farbe haben.

II. Experimentelle Untersuchungen über Streuzersetzung durch verschiedene *Marasmius*-Arten.

Die Rolle der Bodenpilze bei Zersetzung des toten Pflanzenmaterials und bei der Humusbildung in der Natur ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Bloss einige wenige von denen, welche von grösserer Wichtigkeit für die vorliegende Arbeit sind, sollen hier erwähnt werden. Ausführliche Übersichten über die Literatur auf diesem Gebiet findet man bei Waksman (1927, 1936) u. a.

Müller (1887, S. 27) fand, dass Pilzmyzelien, darunter auch schnallentragende, reichlich in Buchenwäldern mit Rohhumus („Torf" nach Müller) vorkommen. Er hebt vor allem die Eigenschaft der Myzelien als verfilzender Elemente in der Vermoderungsschicht und die ausserordentliche Widerstandskraft gewisser Myzelien gegen Zersetzung hervor. Auch Frank (1888) und Wollny (1897) haben auf das reiche Vorkommen von Pilzmyzelien in der Humusdecke des Waldbodens hingewiesen. Koning (1904) zog den Schluss, dass Pilze, besonders Hyphomyzeten, eine grosse Rolle beim Abbau der Streu und bei der Humusbildung spielen.

Experimentelle Untersuchungen über die Zellulosezersetzung durch Bodenpilze sind von van Iterson (1904) ausgeführt worden. Seine Resultate wurden jedoch starker Kritik unterzogen. Später konnten indes McBeth & Scales (1913), Scales (1915), Otto (1916) u. a. einwandfrei nachweisen, dass mehrere aus dem Boden isolierte Pilze (Ascomyzeten und *Fungi imperfecti*) Zellulose zersetzen.

Mehrere Forscher haben nachher den Abbau der Streu durch verschiedene Bodenorganismen experimentell untersucht. Gewöhnlich impften sie Streu verschiedener Art mit Suspensionen von Erde. Die Zersetzung wurde dann durch kontinuierliche Bestimmung der Kohlensäureproduktion oder durch Feststellung der totalen Menge und chemischen Zusammensetzung des Streumaterials zu Beginn und am Ende des Versuches oder auch durch Kombination dieser beiden Methoden studiert (Waksman & Tenney 1927, 1928; Rege 1927; Helbig & Jung 1929; Melin 1930 u. a.). Die wirksamen Organismen bestanden bei Versuchen dieser Art natürlich sowohl in Bakterien als in Pilzen. In der Regel konnte man eine Abnahme der totalen Menge des Materials und seiner verschiedenen chemischen Bestandteile konstatieren. Die Zersetzung von Lignin war jedoch gewöhn-

lich sehr unbedeutend. Obgleich einige Autoren darauf hingewiesen haben, dass gewisse aus dem Boden isolierte Bakterien und niedrige Pilze isoliertes Lignin zersetzen können (Pringsheim & Fuchs 1923, Waksman & Hutchings 1936), hat die Kenntnis der biologischen Zersetzung des Lignins im Boden so geringe Fortschritte gemacht, dass Russel noch 1936 schreibt: „Obwohl Lignin im Boden einer Zersetzung unterliegt, ist nichts bekannt über den Verlauf oder die Organismen, die dies verursachen."

Von einer Gruppe von Organismen, nämlich einem Teil der holzzersetzenden Pilze, weiss man indes seit langem, dass sie Lignin zersetzen können (vgl. S. 37). Nach vieljährigen Studien über die verschiedenen Fäulen des Holzes stellte Falck (1923) die Hypothese auf, dass gewisse Hutpilze des Waldbodens die Streu in derselben Weise angreifen wie die holzzersetzenden Pilze das Holz. Durch Züchtung einiger Streupilze auf sterilisiertem Buchenlaub und Kiefernnadeln, deren Zusammensetzung vor und nach dem Versuch bestimmt wurde, konnte er auch die Richtigkeit seiner Annahme beweisen (Falck 1930). Waksman und seine Mitarbeiter haben gewisse Hutpilze von mehr koprophilem Charakter in Reinkultur auf sterilisierten natürlichen Substraten gezüchtet und festgestellt, dass *Psalliota campestris* und *Coprinus radians* sowohl Lignin als Zellulose zersetzen (Waksman & McGrath 1931, Waksman 1931). Hymenomyzeten, welche endotrophe Mykorrhiza bei Orchideen bilden, sind von Holländer (1932) studiert worden. Dieser hat qualitativ nachgewiesen, dass diese Pilze, wenn sie auf sterilisiertem Streumaterial gezüchtet werden, Lignin und Zellulose zersetzen. Dagegen lassen sich die Mykorrhizapilze der Nadelbäume nicht ohne weiteres auf autoklav-sterilisierter Streu züchten (Melin 1923, S. 172; 1925, S. 46).

Früher veröffentlichte Beobachtungen über die Einwirkung der in dieser Arbeit behandelten *Marasmius*-Arten auf die Streu in der Natur scheinen zu zeigen, dass wenigstens ein Teil dieser Pilze intensive Streuzersetzer sind. So beobachtete Baillon (1906) bei *Marasmius oreades*, welcher „Hexenringe" auf Grasboden bildet, dass die Erde durch den Einfluss des Pilzes eine gelbliche Farbe bekommt und leicht pulverisierbar, porös, locker und auffallend trocken wird. Semb (1936) fand, dass der Stickstoffumsatz im Boden unter dem Einfluss von Myzelien von *M. oreades* lebhafter wird. Eine Zersetzung von Waldstreu durch gewisse andere *Marasmius*-Arten wurde in der Natur von Romell (1934) beobachtet.

Im folgenden berichte ich über experimentelle Untersuchungen über die Fähigkeit der von mir reingezüchteten *Marasmius*-Arten, Streu zu zersetzen. Besondere Aufmerksamkeit habe ich bei diesen Untersuchungen der Frage zugewandt, ob die Pilze Lignin, Zellulose und furfurol-

liefernde Substanzen abbauen können. Diese Komponenten machen zusammen mehr als die Hälfte der organischen Masse der Laub- und Nadelstreu aus. In stärker verholzter Streu spielen sie eine noch grössere Rolle.

A. Ausführung der Versuche.

Aus Tab. 1 geht hervor, dass die Pilze, welche bei dieser Arbeit als Versuchsobjekte dienten, von Substraten sehr wechselnder Natur gesammelt wurden. Es wäre natürlich von Interesse gewesen, das Zersetzungsvermögen jeder Art dadurch zu untersuchen, dass man sie auf dem für sie natürlichen Substrat gezüchtet hätte. Vorbereitende Versuche ergaben indes, dass sich die Pilze auch auf anderem sterilisierten Streumaterial züchten lassen als dem, auf welchem sie in der Natur vorkommen. Um den Umfang der Versuche zu verringern, wurden deshalb bloss vier verschiedene Arten von Streu für Zersetzungsversuche mit sämtlichen Pilzarten verwendet.

Eine Voraussetzung für ein erfolgreiches quantitatives Studium der Streuzersetzung ist, dass das benutzte Ausgangsmaterial eine möglichst gleichmässige Zusammensetzung hat. Zwei verschiedene Proben desselben müssen ja bei chemischer Analyse innerhalb ziemlich enger Grenzen übereinstimmende Resultate ergeben. Bei der Sammlung der verschiedenen Streuarten wurde deshalb grösstmögliche Einheitlichkeit angestrebt.

Folgendes Streumaterial wurde benutzt:

1. Kiefernnadeln. Verwelkte Nadeln, die abgefallen, aber auf den unteren Zweigen der Bäume liegen geblieben und deshalb noch nicht nennenswert von Bodenorganismen angegriffen worden waren, wurden im April 1941 gesammelt. Ort: Nåntuna, Danmark.
2. Buchenlaub. Das Material bestand aus Laub, das den Winter über an den Bäumen gesessen hatte und im April 1941 direkt von diesen gesammelt wurde. Ort: Park beim Uppsalaer Schloss, Uppsala.
3. Espenlaub. Das Material wurde unmittelbar nach dem Abfallen des Laubes im Oktober 1940 gesammelt. Ort: Fäbodarna, Bondkyrka.
4. Stroh von *Glyceria maxima*. Das Material bestand aus abgestorbenen, unmittelbar nach der Schneeschmelze im April 1938 gesammelten Pflanzen. Ort: Ultuna, Bondkyrka.

Das Streumaterial wurde im Laboratorium an der Luft getrocknet. Nachdem sein Wassergehalt bestimmt worden war, wurden Portionen von 5,00 g in Erlenmeyerkolben von 300 ccm Volumen eingewogen (das Stroh-

material jedoch erst, nachdem es in 3—4 cm lange Stücke zerschnitten worden war). Jedem Kolben wurden 50 ccm Wasser zugesetzt, worauf die Kolben mit Wattestöpseln versehen und zu einem Überdruck von 1,2 kg per qcm (etwa 120°) autoklaviert wurden.

Es konnte vorausgesetzt werden, dass man das stärkste Wachstum der Pilze erhalten würde, wenn man sie auf Streumaterial impfte, welches möglichst mit dem natürlichen Substrat übereinstimmte (vgl. Falck 1930). Das sterilisierte Streumaterial wurde deshalb mit Reinkulturen der verschiedenen *Marasmius*-Stämme nach folgendem Plan geimpft:

Kiefernnadeln:	*M. androsaceus* E, *M. chordalis*, *M. fulvobulbillosus* B, *M. perforans* H, *M. peronatus* B, *M. putillus*, *M. rotula* B und *M. scorodonius* A.
Buchenlaub:	*M. alliaceus*, *M. foetidus* B, *M. putillus*, *M. ramealis* B und *M. scorodonius* A.
Espenlaub:	*M. epiphyllus*.
Stroh:	*M. graminum* und *M. oreades* B.

Die Impfung erfolgte von Kulturen auf Malzagar. In jedem einzelnen Fall wurden 4 Parallelkolben mit ein und demselben Pilz geimpft. Ausserdem wurden von jeder Streuart 4 Kontrollkolben verwendet, welche nicht geimpft wurden.

Die Kulturen wurden 6—7 Monate im Thermostaten bei 25° aufbewahrt. Der Wasserabgang wurde durch jeden zweiten Monat wiederholte Wägung der Kontrollkolben kontrolliert, worauf der gefundene Wasserverlust in sämtlichen Kolben durch Zusatz von sterilem Wasser ersetzt wurde.

Nach der Impfung wurde der Inhalt der Kolben mehr oder minder rasch von den betreffenden Pilzmyzelien überwachsen. Der Teil des Streumaterials in den Kolben, der sich unter der Wasseroberfläche befand, wurde jedoch nicht von den Myzelien angegriffen, vermutlich infolge des dort herrschenden Sauerstoffmangels. In dem übrigen Teil des Streumaterials entwickelten sich die Myzelien im Verhältnis zum Feuchtigkeitsgehalt des Materials, der mit dem Abstand vom Boden des Kolbens abnahm. Infolgedessen wurde also das Streumaterial in den Kolben nicht gleichmässig von den Pilzen angegriffen. Im Zusammenhang mit jedem Wasserzusatz wurde deshalb das Material mit einer sterilisierten Impfnadel gründlich umgerührt.

Alle die Pilze, welche auf Buchenlaub verimpft worden waren, entfärbten während ihres Wachstums das Laubmaterial mehr oder minder vollständig. Gleichzeitig sank dieses stark zusammen. Die Nadelstreu

wurde weniger rasch beeinflusst. Auch hier war jedoch in mehreren Fällen eine deutliche Entfärbung zu bemerken, besonders in den Kolben, die mit *Marasmius peronatus*, *M. putillus* und *M. scorodonius* geimpft worden waren. Eine etwas schwächere Entfärbung bewirkten *M. androsaceus*, *M. perforans* und *M. fulvobulbillosus*, während *M. chordalis* und *M. rotula* das Aussehen der Nadeln nicht merklich veränderten. Die mit *M. epiphyllus* geimpften Espenblätter wurden von Myzel überwachsen, wiesen aber keine Entfärbung auf. Das Strohmaterial mit den Kulturen von *M. oreades* erfuhr eine gewisse Bleichung, während *M. graminum* keine äusserlich sichtbare Veränderung des Materials hervorrief.

Nach dem Ende der Versuchszeit wurde das pH für den Inhalt eines der vier Kolben jeder Reihe bestimmt. Die Bestimmungen erfolgten mit einem Beckman-Potentiometer, und die verwendeten Flüssigkeitsmengen wurden nach den Bestimmungen in ihre Kolben zurückgegossen. Der Inhalt der Kolben wurde dann quantitativ in gewogene Glasschalen überführt und drei Tage bei 60°—65° getrocknet. (Die Trocknung fand bei relativ niedriger Temperatur statt, um eventuelle Veränderungen der chemischen Zusammensetzung des Materials zu vermeiden.) Hierauf liess ich die Schalen weitere drei Tage im Laboratorium stehen, damit der Inhalt hinsichtlich des Wassergehalts mit der Luftfeuchtigkeit ins Gleichgewicht kommen sollte. Durch Wägen wurde dann das Gewicht des Rückstandes in jedem Kolben festgestellt. Für die folgenden Analysen wurde das Material in einer Mühle gemahlen, wobei die Rückstände der vier Parallelkolben jeder Reihe sorgfältig miteinander gemischt wurden. Nach Bestimmung des Wassergehalts wurde das Material in bezug auf Lignin, Zellulose und furfurolliefernde Substanzen analysiert.

B. **Analysenmethoden.**

Lignin wurde gravimetrisch als Lignin-Thioglykolsäure nach Holmbergs Methode (Holmberg 1930, 1934, 1936), modifiziert von Bengtsson (1936 a), bestimmt. Dieses Verfahren gründet sich darauf, dass sich Lignin in Anwesenheit einer starken katalysierenden Säure mit Thioglykolsäure zu Lignin-Thioglykolsäuren verbinden lässt, welche schwerlöslich in Wasser und Säuren, dagegen leichtlöslich in Alkalien sind.

Die Probe wird auf dem Wasserbad mit Thioglykolsäure in salzsaurer Lösung behandelt. Wasserlösliche Substanzen sowie solche, welche durch den Einfluss von warmer, verdünnter HCl hydrolysiert werden (Hemizellulosen), gehen dabei in Lösung. Das Lignin wird in Lignin-Thioglykolsäure überführt, die jedoch in der salzsauren Lösung unlöslich ist. Die Zellulose endlich bleibt praktisch unverändert (vgl. S. 26). Nachdem die Erwär-

mung auf dem Wasserbad beendet ist, wird die saure Lösung abfiltriert und dem festen Rückstand verdünnte KOH zugesetzt, wobei die Lignin-Thioglykolsäure in Lösung geht. Die alkalische Lösung wird von dem hauptsächlich aus Zellulose bestehenden Rest abfiltriert und aus derselben dann die Lignin-Thioglykolsäure durch Ansäuern mit HCl ausgefällt. Die Fällung wird gewaschen, getrocknet, gewogen, verascht und schliesslich nochmals gewogen, wodurch man also die Gewichtsmenge aschefreie Lignin-Thioglykolsäure erhält.

Bei den Bestimmungen wurde jede Probe mit 1,5 ccm Thioglykolsäure und 20 ccm 2-n HCl behandelt. Im Hinblick auf die folgende Zellulosebestimmung wurde die in Alkali gelöste Lignin-Thioglykolsäure von dem ungelösten Rest durch ein Filter abfiltriert, das gleichmässig mit feinem, analysenreinem Sand belegt war. Nach Waschen mit 1/15-n KOH wurde der Rückstand auf dem Filter nebst dem Sand in eine Lovén-Flasche gespült, die in einen Thermostaten von 70°—80° gesetzt wurde. Nachdem der Inhalt getrocknet war, wurde die Zellulose bestimmt (siehe unten). Bei den Ligninbestimmungen wurde im übrigen genau das von Bengtsson (l. c. S. 6—8) beschriebene Verfahren angewandt.

Die **Zellulose** wurde gleichfalls gravimetrisch nach Charpentiers Methode (Charpentier 1920), modifiziert von Barthel & Bengtsson (1923) sowie von Bengtsson (1925), bestimmt. Die Zellulose wird nach diesem Verfahren durch Schütteln der trocknen Probe mit Schweizerschem Reagens extrahiert. Aus einem bestimmten Teil der Lösung wird dann die Zellulose durch Zusatz von 80 %igem Alkohol ausgefällt. Die ausgefällte Zellulose wird gewaschen, getrocknet, gewogen und verascht, worauf sie abermals gewogen wird.

Für die Bestimmungen wurden in diesem Fall die getrockneten Zellulosereste der Proben verwendet, die bei den Ligninbestimmungen benutzt worden waren.

Auf Vorschlag von Fil. lic. N. Bengtsson wurden hier folgende Veränderungen der Analysenmethodik vorgenommen:

1. Um allen Sand vollständig aus der Schweizerschen Lösung mit der aufgelösten Zellulose zu entfernen, wurde die Lösung vor der Fällung der Zellulose zentrifugiert.

2. Die mit Alkohol ausgefällte und in Alundumtiegeln gesammelte Zellulose wurde zuerst 1 Stunde bei 50° und dann 1 Stunde bei 80° getrocknet. Hierauf wurde die Zellulose mit Hilfe eines steifen Pinsels quantitativ in soeben geglühte und abgekühlte Porzellantiegel verbracht. In diesen wurde sie bei herabgesetztem Druck über P_2O_5 bis zum folgenden Tag getrocknet, worauf die Tiegel gewogen, geglüht und (nach Abkühlung) erneut gewogen wurden.

Tabelle 2.

Gehalt der unzersetzten Kiefernnadeln an Lignin (als Lignin-Thioglykolsäure) und Zellulose.

Trockensubstanz mg	Lignin-Thioglykolsäure			Zellulose	
	Gefunden mg	Korrigiert mg	%	Gefunden mg	%
191,4	36,9	41,9	21,89	53,6	28,00
191,1	41,1	46,1	24,12	53,0	27,73
381,8	84,9	89,9	23,58	104,2	27,33
382,5	85,8	90,8	23,74	110,0	28,76
574,5	122,6	127,6	22,21	147,0	25,59
578,9	126,9	131,9	22,98	162,0	28,23
766,8	174,9	179,9	23,46	199,2	25,98
764,7	186,8	191,8	25,08	219,2	28,66
955,0	216,9	221,9	23,24	250,6	26,24
954,7	227,0	232,0	24,30	262,4	27,49
1149,7	274,1	279,1	24,28	318,4	27,69
1146,1	257,0	262,0	22,86	309,8	27,03
		M = 23,08			M = 27,39

Das Verhalten der Pilze gegenüber den widerstandsfähigsten Bestandteilen des Streumaterials, Lignin und Zellulose, wurde bei dieser Untersuchung als die wichtigste Frage betrachtet. Die Reproduzierbarkeit der angewandten Methoden für Bestimmung dieser Substanzen wurde zunächst einer Prüfung unterzogen. Dies geschah in der Weise, dass von jeder Streuart eine grössere Anzahl Proben, welche ca. 200—ca. 1200 mg Substanz enthielten, analysiert wurden. Für diese Kontrollanalysen wurde der Inhalt der nicht geimpften Kontrollproben benutzt. Das Material, welches analysiert wurde, hatte also Autoklavierung durchgemacht. Die Resultate finden sich in den Tabellen 2—5 und in den Diagrammen, Fig. 1—2.

Die relative Ausbeute an Lignin-Thioglykolsäure stieg wie bei den von Bengtsson (1936 a) ausgeführten Analysen mit wachsender Menge der Probe. Der Zusammenhang zwischen der gefundenen Menge Lignin-Thioglykolsäure und der Grösse der analysierten Probe war jedoch linear, und der eben erwähnte Sachverhalt muss darauf beruht haben, dass sich bei jedem Material eine gewisse Menge Lignin der Bestimmung entzogen hat. Dieser Verlust, welcher unabhängig von der absoluten Grösse der Probe war, entsprach offensichtlich der totalen Löslichkeit der Lignin-Thiogly-

Tabelle 3.

Gehalt des unzersetzten Buchenlaubs an Lignin (als Lignin-Thioglykolsäure) und Zellulose.

Trocken-substanz mg	Lignin-Thioglykolsäure			Zellulose	
	Gefunden mg	Korrigiert mg	%	Gefunden mg	%
188,8	35,1	51,1	27,07	32,6	17,27
189,4	30,0	46,0	24,29	34,0	17,95
381,4	75,2	91,2	23,91	60,2	15,78
378,3	81,5	97,5	25,77	64,4	17,02
567,3	129,6	145,6	25,67	96,4	16,99
569,2	131,9	147,9	25,98	94,6	16,62
756,7	176,4	192,4	25,43	123,0	16,25
756,4	177,0	193,0	25,52	121,6	16,08
944,2	227,1	243,1	25,75	154,2	16,33
946,6	231,3	247,3	26,13	155,8	16,46
1135,5	283,5	299,5	26,38	183,8	16,19
1137,1	281,4	297,4	26,15	189,4	16,66
			M = 25,67		M = 16,63

kolsäure in den bei der Analyse verwendeten salzsauren Lösungen, in denen die Hauptmasse der Lignin-Thioglykolsäure in fester Form vorlag. Der Verlust kann direkt aus den Diagrammen abgelesen werden. Die gerade Linie, die durch die Punkte gezogen ist, welche die für die verschiedenen Proben gefundenen Gewichtsmengen Lignin-Thioglykolsäure angeben, schneidet die vertikale Achse des Diagramms auf der negativen Seite. Der Abstand dieses Schnittpunkts vom Origo gibt den erwähnten Verlust an. Derselbe betrug für Kiefernnadeln 5 mg, für Buchenlaub 16 mg, für Espenlaub 14 mg und für Stroh 9 mg. Die gefundenen Werte der Lignin-Thioglykolsäure müssen also durch Hinzufügung dieser Mengen korrigiert werden.

Auch die korrigierten Werte des Ligningehalts sind indes wahrscheinlich etwas zu niedrig. Um das Lignin vollständig zu extrahieren, behandelte nämlich Holmberg bei seiner ursprünglichen Analysenmethode jede Probe zweimal mit Thioglykolsäure und HCl. Durch die zweite Behandlung erhielt er hierbei eine Menge Lignin-Thioglykolsäure, welche (für Fichtenholz) ca. 5 % der totalen Ausbeute entsprach. Bei dem von Bengtsson modifizierten Verfahren unterbleibt diese zweite Behandlung mit Thioglykolsäure und HCl.

Tabelle 4.

Gehalt des unzersetzten Espenlaubs an Lignin (als Lignin-Thioglykolsäure) und Zellulose.

Trocken-substanz mg	Lignin-Thioglykolsäure			Zellulose	
	Gefunden mg	Korrigiert mg	%	Gefunden mg	%
188,0	27,8	41,8	22,23	28,0	14,89
188,4	26,3	40,3	21,39	28,0	14,86
377,6	70,1	84,1	22,27	55,8	14,78
376,5	65,1	79,1	21,01	54,8	14,56
565,1	97,4	111,4	19,71	76,4	13,52
565,1	102,5	116,5	20,62	77,8	13,77
755,8	141,6	155,6	20,59	104,4	13,81
754,3	139,7	153,7	20,38	104,0	13,79
942,5	192,0	206,0	21,86	134,6	14,28
943,2	196,4	210,4	22,31	116,8	12,38
1131,2	237,0	251,0	22,19	149,4	13,21
1131,2	250,1	264,1	23,35	130,6	11,55
			M = 21,49		M = 13,78

Zwecks weiterer Kontrolle der Analysenmethode wurden die aus den unzersetzten Streuarten erhaltenen Lignin-Thioglykolsäuren in bezug auf C, H, S, OCH_3 und N analysiert.[1] Die Analysenresultate, korrigiert unter Berücksichtigung des Feuchtigkeits- und des Aschegehalts der Lignin-Thioglykolsäurepräparate, sind in Tab. 6 zusammengestellt. Auf Grund der Ziffern für den S-Gehalt wurde der Gehalt an thioglykolsäurefreiem Lignin (Holmberg & Gralén 1942, S. 4—5) für die verschiedenen Streuarten berechnet (Tab. 8). Die Zusammensetzung der thioglykolsäurefreien Produkte ist aus Tab. 7 ersichtlich.

Aus Tab. 6 geht hervor, dass aus den verschiedenen Streuarten Lignin-Thioglykolsäuren von etwas ungleicher Zusammensetzung gewonnen wurden. Dies dürfte die Ursache gewesen sein, dass die Verluste, die bei den Ligninbestimmungen eintraten, für die verschiedenen Streuarten ver-

[1] Prof. Holmberg hatte die Freundlichkeit, die Bestimmungen von C, H, S und OCH_3 in seinem Laboratorium an der Kgl. Technischen Hochschule, Stockholm, ausführen zu lassen. N wurde am Physikalisch-Chemischen Institut in Uppsala von Frau Brita Wikén bestimmt. Dabei wurde Kjeldahls Verfahren nach Lundin & Ellburg (1929, siehe auch Lundin, Ellburg & Riehm 1935), modifiziert zur Halbmikromethode, angewandt. Die Destillation erfolgte nach Parnas-Wagner.

Tabelle 5.

Gehalt des unzersetzten Strohs an Lignin (als Lignin-Thioglykolsäure) und Zellulose.

Trocken-substanz mg	Lignin-Thioglykolsäure			Zellulose	
	Gefunden mg	Korrigiert mg	%	Gefunden mg	%
190,4	19,2	28,2	14,81	51,4	27,00
191,5	17,4	26,4	13,79	52,0	27,15
380,3	41,9	50,9	13,38	92,4	24,30
382,4	42,9	51,9	13,57	100,2	26,20
573,6	69,3	78,3	13,65	143,2	24,97
573,6	70,5	79,5	13,86	154,4	26,92
763,2	92,1	101,1	13,25	205,8	26,97
764,2	97,1	106,1	13,88	192,2	25,15
952,3	125,4	134,4	14,11	249,6	26,21
955,1	122,1	131,1	13,73	252,0	26,38
1145,1	160,2	169,2	14,78	295,6	25,81
1144,2	154,7	163,7	14,31	299,2	26,15
			M = 13,93		M = 26,10

schieden gross waren. Der S-Gehalt der Lignin-Thioglykolsäuren betrug 4,03—5,80 %. Bengtsson (1936 a) erhielt aus Weizenstroh eine Lignin-Thioglykolsäure mit 5,52 % S. Dagegen bekam Holmberg nach seiner ursprünglichen Methode bei Analyse von verschiedenem Pflanzenmaterial Lignin-Thioglykolsäuren mit etwas höheren S-Gehalten. So lieferte z. B. Roggenstroh eine Lignin-Thioglykolsäure mit 7,57 % S. Es scheint also, dass Bengtssons Modifikation von Holmbergs Ligninbestimmungsmethode Lignin-Thioglykolsäuren liefert, die einen niedrigeren S-Gehalt haben als die Produkte, welche man nach Holmbergs ursprünglichem Verfahren erhält.

Der Methoxylgehalt war gleichfalls niedriger als der, welchen Holmberg für seine Produkte fand. Holmbergs Untersuchungsmaterial umfasste jedoch hauptsächlich stark verholzte Pflanzenteile, und Blätter wurden nicht untersucht. Es ist indes nicht ausgeschlossen, dass das Lignin in Blättern eine Zusammensetzung haben kann, die etwas von der des Lignins in stark verholzten Pflanzenteilen abweicht.

Es ist bemerkenswert, dass die Lignin-Thioglykolsäurepräparate N-haltig waren. N-haltige Produkte bekam auch Holmberg (1934) bei Analyse von Fruchtkörpern von *Polyporus fomentarius* und Bengtsson (1936 a)

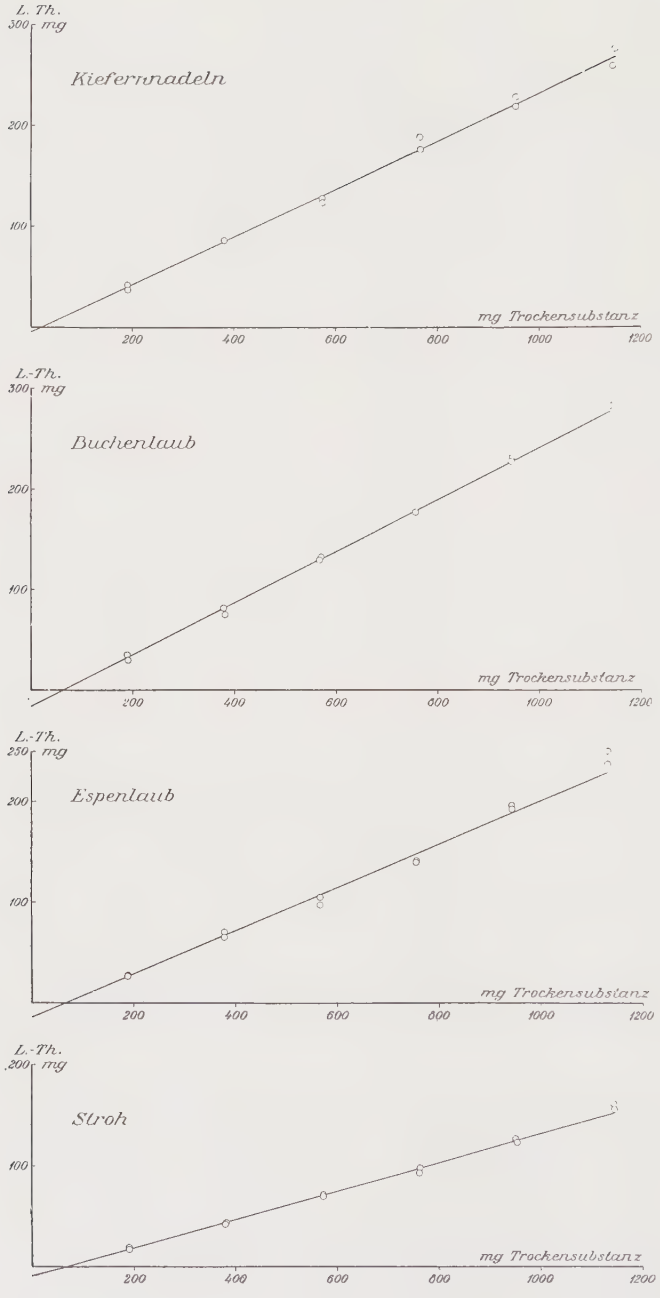

Fig. 1. Gehalt der unzersetzten Streuarten an Lignin als Lignin-Thioglykolsäure, „L.-Th." (Tab. 2–5).

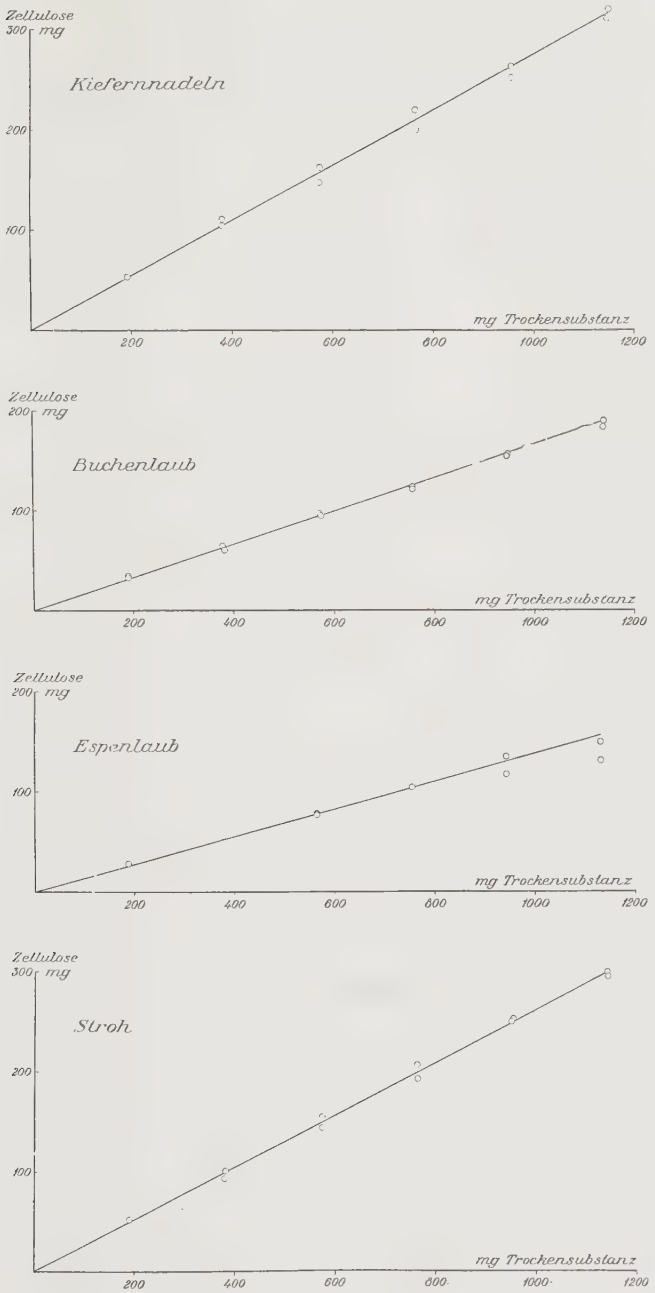

Fig. 2. Gehalt der unzersetzten Streuarten an Zellulose (Tab. 2—5).

Tabelle 6.

Zusammensetzung der Lignin-Thioglykolsäuren.

Ausgangsmaterial	% C	% H	% O	% N	% S	% OCH_3
Kiefernnadeln. . .	62,87	6,70	23,87	0,76	5,80	4,45
Buchenlaub. . . .	59,66	5,85	28,23	1,07	5,19	6,49
Espenlaub	57,06	5,29	32,26	1,04	4,35	4,46
Stroh	60,57	6,22	26,51	2,67	4,03	7,42

Tabelle 7.

Zusammensetzung der thioglykolsäurefreien Ligninpräparate.

Ausgangsmaterial	% C	% H	% O	% N	% OCH_3
Kiefernnadeln. . .	67,59	7,32	24,21	0,88	5,14
Buchenlaub. . . .	63,37	6,27	29,14	1,22	7,37
Espenlaub	59,81	5,58	33,45	1,16	4,96
Stroh	63,46	6,58	27,02	2,94	8,18

bei Analyse von Weizenstroh. Bengtsson (1936 a, 1938) wies nach, dass der N-Gehalt der Lignin-Thioglykolsäurepräparate höchstwahrscheinlich auf der Anwesenheit von Eiweißstoffen beruht. Auch wenn Lignin als der in starken Säuren unlösliche Teil des Pflanzenmaterials bestimmt wird, wirken anwesende Eiweißstoffe in derselben Weise störend (vgl. Norman 1937, S. 175). Eine Korrektion wegen dieses N-Gehalts der Ligninpräparate ist dadurch erschwert, dass man nicht weiss, in welcher Form der Stickstoff vorliegt, und eine solche ist deshalb in diesem Fall nicht vorgenommen worden.

Die Zelluloseausbeute, ausgedrückt in Prozenten, war unabhängig von der Grösse der Probe. Eine Frage, die indes berührt werden muss, ist, ob die Behandlung der Proben mit Thioglykolsäure in salzsaurer Lösung einen Verlust von Zellulose herbeigeführt haben kann. Bei Versuchen mit Baumwolle und Filtrierpapier fand Holmberg (1930), dass der Zellulosegehalt nach 4-stündiger Behandlung mit Thioglykolsäure und HCl um 9 bzw. 5 % gesunken war. Ferner untersuchte Bengtsson (Privatmitteilung) die Zelluloseausbeute bei Analyse von Weizenstroh, dessen Zellulose von inkrustierenden Substanzen einerseits mittels Bisulfit-Salzsäurelösung (Bengtsson 1925), andererseits mittels Thioglykolsäure und HCl befreit wurde. In beiden Fällen bestimmte er die Zellulose nach Charpentiers

modifizierter, obenerwähnter Methodik. Es zeigte sich, dass die Thioglykolsäuremethode eine 4,4 % geringere Zelluloseausbeute gab als die Bisulfitmethode. Es ist also klar, dass die Behandlung mit Thioglykolsäure und HCl einen gewissen Zelluloseverlust verursacht, der auf ca. 5 % geschätzt werden kann.

Aus dem Obigen geht hervor, dass die angewandten Methoden zur Bestimmung von Lignin und Zellulose mit gewissen Fehlerquellen behaftet sind. Die Ausbeute sowohl an Lignin als an Zellulose ist nämlich etwas geringer als der wirkliche Gehalt des Pflanzenmaterials an diesen Stoffen, und bei der Bestimmung von Lignin ist eine gewisse Mitbestimmung von Eiweißstoffen unvermeidbar. Der letztgenannte Fehler wächst natürlich mit dem Eiweissgehalt des Materials.

Andererseits ist hervorzuheben, dass von den Methoden zur Ligninbestimmung die von Holmberg diejenige sein dürfte, mit der man das Lignin in am wenigsten denaturiertem Zustand erhält. Deshalb ist sie den Methoden vorzuziehen, nach denen das Lignin als der in konzentrierten Säuren unlösliche Teil der Pflanzensubstanz bestimmt wird (Klason 1908, Willstätter & Zechmeister 1913, Schwalbe 1925).

Das hier angewandte Verfahren ist ausserdem gut reproduzierbar, gestattet Bestimmung von Lignin und Zellulose in ein und derselben Probe und ist nicht allzu zeitraubend. Seine Anwendung bei Untersuchungen, die in erster Linie einen Vergleich des Lignin- und Zellulosegehalts verschiedenen Pflanzenmaterials bezwecken, dürfte deshalb als berechtigt angesehen werden können.

Furfurolliefernde Substanzen („Pentosane") wurden nach der Methode von Kullgren & Tydén bestimmt (Kullgren & Tydén 1929; siehe auch Bengtsson 1936 a). Das Verfahren gründet sich auf denselben Umstand wie die von Tollens und seinen Mitarbeitern ausgearbeitete Methode zur Bestimmung von Pentosanen und Pentosen, dass diese nämlich bei Erhitzung mit HCl Furfurol bilden, welches zusammen mit Wasser- und Salzsäuredämpfen hinüberdestilliert. Nach Kullgren & Tydén wird die Probe mit 13,15 %iger HCl gekocht, die mit NaCl gesättigt wird. Diese Lösung kocht mit konstanter Zusammensetzung und bei konstanter Temperatur. Während der Destillation wird die überdestillierte HCl sukzessiv ersetzt. Das Furfurol wird durch Titrieren mit Bromat bestimmt. Bei Berechnung des Gehalts an furfurolliefernden Substanzen wird ein Umrechnungsfaktor benutzt, der unter der Annahme abgeleitet wurde, dass diese Substanzen zur Hälfte aus Araban und zur Hälfte aus Xylan bestehen.

In Pflanzensubstanz kommen mehrere Bestandteile vor, die bei Erhitzen mit HCl Furfurol bilden. Unter diesen sind die Hemizellulosen

quantitativ am wichtigsten. Während man früher mit SCHULZE (Literaturangaben bei CZAPEK 1913) annahm, dass die inkrustierenden Hemizellulosen bloss aus Pentose- und Hexoseeinheiten aufgebaut seien, hat man neuerdings gefunden, dass sie ausserdem fast ausnahmslos Uronsäureeinheiten enthalten (O'DWYER 1926, NORMAN 1929). Wenn die Pflanzensubstanz mit HCl erhitzt wird, werden die Hemizellulosen hydrolysiert, und sowohl die Pentosen als die Uronsäuren bilden Furfurol. Die Hexosen liefern gleichzeitig eine gewisse Menge Oxymethylfurfurol. (Im Destillat dürfte man nach KULLGREN & TYDÉN eine Menge Oxymethylfurfurol bekommen, welche 1—2 % der Hexosenmenge entspricht.) Auch von den Pektinsubstanzen, welche sowohl Pentose- als Uronsäureeinheiten enthalten, werden gewisse Mengen Furfurol gebildet (EHRLICH 1927). Die natürliche Zellulose enthält schliesslich eine Fraktion Polysaccharide, die sich von der eigentlichen Zellulose unter anderm dadurch unterscheidet, dass sie von ziemlich verdünnten Säuren hydrolysiert wird. Bei den meisten Pflanzen besteht diese Fraktion hauptsächlich aus Xylan, das bei Erhitzen mit HCl Furfurol liefert (NORMAN 1937).

Die Stoffe, welche bei Erhitzung von Pflanzensubstanz mit HCl Furfurol bilden, sind also nur zu einem Teil eigentliche Pentosane. Die Furfurolmengen, die von jeder einzelnen der soeben erwähnten Stoffgruppen stammen, voneinander zu unterscheiden, schien mir indes nicht im Rahmen dieser Untersuchung zu liegen. Für diesen Zweck wäre ein Analysenverfahren notwendig gewesen, welches bedeutend umfassender gewesen wäre als die hier angewandte Methode (NORMAN 1929).

Der Uronsäuregehalt des Materials hat zur Folge, dass man bei Benutzung von KULLGRENS & TYDÉNS Umrechnungsfaktor etwas zu niedrige Werte für die Gewichtsmenge der furfurolliefernden Substanzen bekommt. Auch im übrigen ist diese Analysenmethode mit gewissen Mängeln behaftet, was indes in gleich hohem Grade für alle andern Methoden zur Bestimmung furfurolliefernder Substanzen gelten dürfte (vgl. NORMAN 1937, JAYME & SARTEN 1941).

BENGTSSON (1936 b) fand, dass ein gewisser Gehalt der Probe an Nitrat- oder Nitritstickstoff zur Folge haben kann, dass man zu niedrige Werte bei „Pentosanbestimmungen" nach KULLGREN & TYDÉN erhält. Ein Nitratstickstoffgehalt von 1 ‰ hat jedoch keinen störenden Einfluss auf die Analyse.

Bestimmungen von Nitrat- und Nitritstickstoff in den von mir benutzten Streuarten ergaben folgendes Resultat (die Bestimmungen erfolgten nach BENGTSSONS Modifikation der Rothamsted-Methode, siehe BENGTSSON 1932, S. 9):

Kiefernnadeln 0,03 ‰
Buchenlaub 0,15 ‰
Espenlaub 0,02 ‰
Stroh 0,23 ‰.

Die Menge Nitrat- und Nitritstickstoff war also so gering, dass sie die Bestimmungen furfurolliefernder Substanzen nicht beeinflusst haben kann.

Für jede der unzersetzten Streuarten wurde die Menge furfurolliefernder Substanzen in drei Proben bestimmt und dann der Mittelwert für diese Bestimmungen berechnet.

Der Gehalt der unzersetzten Streuarten an Lignin, Zellulose, furfurolliefernden Substanzen und Asche, berechnet an wasserfreiem Material, ergibt sich aus Tab. 8.

Tabelle 8.

Gehalt der unzersetzten Streuarten an Lignin, Zellulose, furfurolliefernden Substanzen und Asche.

Streuart	Lignin		Zellulose %	Furfurolliefernde Substanzen %	Asche %
	als L.-Th. %	Thioglykolsäurefreies L. %			
Kiefernnadeln . .	23,48	20,33	27,39	8,49	2,37
Buchenlaub . . .	25,67	22,59	16,63	17,55	8,23
Espenlaub	21,49	19,33	13,78	16,63	8,92
Stroh	13,93	12,63	26,10	23,34	10,93

Tabelle 9.

Lignin- und Zellulosegehalt von Kiefernnadeln und Buchenlaub nach verschiedenen Verfassern.

Streuart	Lignin %	Zellulose %	Methoden der Bestimmung	Verfasser
Kiefernnadeln .	46,95	37,42	URBAN bzw. SCHMIDT	FALCK 1930
»	20,4[1]	27,3[1]	WILLSTÄTTER & ZECHM. bzw. CROSS & BEVAN	GROSSKOPF 1935
Buchenlaub . .	48,23	29,97	Siehe oben	FALCK 1930
»	19,88[1]	12,11[1]	Siehe oben	GROSSKOPF 1935
»	22,0	15,85	KÖNIG	HELBIG & JUNG 1929

[1] Die Werte wurden auf die totale Trockensubstanz umgerechnet.

Bei früheren Untersuchungen über die Streuzersetzung hat man, wie hier, oft Nadeln von *Pinus silvestris* und Laub von *Fagus silvatica* verwendet und im Zusammenhang damit analysiert. Tab. 9 gibt einige der Literatur entnommene Lignin- und Zellulosewerte für diese Streuarten wieder. Wenn auch das Material der einzelnen Forscher gewisse Verschiedenheiten aufgewiesen haben dürfte, geht doch aus dieser Zusammenstellung deutlich hervor, dass ungleiche Analysenmethoden ganz verschiedene Resultate ergeben können. Falcks auffallend hohe Lignin- und Zellulosewerte dürften sich nicht anders erklären lassen, als dass die Lignin- und Zellulosepräparate, die er bei den Analysen erhielt, stark verunreinigt waren.

Die von Pilzen zersetzte Streu wurde nach folgendem Plan analysiert:

An dem Material jeder Reihe wurden vier Lignin- und Zellulosebestimmungen gemacht, davon zwei an ca. 500 mg und zwei an ca. 1 000 mg eingewogener Probe. Für Korrektion der Lignin-Thioglykolsäurewerte wurden die für das betreffende Kontrollmaterial gefundenen Korrektionswerte benutzt.

Furfurolliefernde Substanzen wurden in zwei Parallelproben jeder Reihe bestimmt.

Der Gehalt der zersetzten Streuproben an Lignin, Zellulose und furfurolliefernden Substanzen sowie der prozentuale Abbau dieser Bestandteile in den einzelnen Reihen ergibt sich aus Tab. 12.

C. Der Einfluss der Pilzmyzelien auf die Analysenresultate.

Der Inhalt der Versuchskolben bestand nach Beendigung des Versuchs aus verschieden stark zersetzter Streu sowie einer gewissen Menge Pilzmyzelien. Da es natürlich unmöglich war, das Myzel von der Streu zu trennen, war es notwendig, die beiden Produkte bei den Analysen zusammen zu behandeln. Deshalb war es wünschenswert, soweit wie möglich festzustellen, inwieweit die Myzelsubstanz die Resultate der Bestimmungen von Lignin, Zellulose und furfurolliefernden Substanzen beeinflusste. Von zwei *Marasmius*-Arten, *M. graminum* und *M. perforans*, wurden darum grössere Myzelmengen durch Kultur in synthetischen Nährlösungen gezüchtet. Nachdem die Myzelien gewaschen, getrocknet und gemahlen worden waren, wurde der Wassergehalt der Myzelsubstanz sowie ihr Gehalt an Lignin, Zellulose und furfurolliefernden Substanzen bestimmt. Die Mittelwerte der mit Rücksicht auf den Wassergehalt korrigierten Analysenresultate ergeben sich aus Tab. 10.

Nach Holmberg (1934) lieferten Fruchtkörper von *Cantharellus cibarius* und nach Bengtsson (1938) Myzelien gewisser Schimmelpilze bei

Tabelle 10.

Gehalt des Myzels von *Marasmius graminum* und *M. perforans* an als Lignin reagierenden Stoffen (als „Lignin-Thioglykolsäure"), Zellulose und furfurolliefernden Substanzen.

Myzel	„Lignin-Thioglykolsäure" %	Zellulose %	Furfurolliefernde Substanzen %
M. graminum .	9,50	0,36	6,37
M. perforans . .	7,81	0,64	4,40

Behandlung mit Thioglykolsäure Produkte, die Lignin-Thioglykolsäure entsprachen. Diese Produkte waren indes stickstoffhaltig und dürften nach den genannten Autoren Kondensationsprodukte oder Mischungen von Proteinen und Thioglykolsäure gewesen sein.

Auch die Myzelien der beiden *Marasmius*-Arten gaben mit Thioglykolsäure eine gewisse Menge „Lignin-Thioglykolsäure". Infolge der Anwesenheit der Myzelien wurden deshalb wahrscheinlich im Vergleich mit den Kontrollen etwas zu hohe Lignin-Thioglykolsäurewerte für die zersetzten Proben erhalten. Indes ist zu bemerken, dass die „Lignin-Thioglykolsäure", die ich bei Analyse der Pilzmyzelien bekam, käseartige Konsistenz und helle Farbe hatte, während die unzersetzte Streu ein sprödes, schokoladenbraunes Produkt lieferte. Die zersetzten Streuproben gaben eine Lignin-Thioglykolsäure, die in Konsistenz und Farbe ganz mit der letzteren übereinstimmte. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die von Myzelsubstanz gebildete „Lignin-Thioglykolsäure" nur einen geringen Teil der Lignin-Thioglykolsäure ausmachte, die bei den Analysen der zersetzten Streuproben bestimmt wurde.

Der Zellulosegehalt der Myzelien war äusserst gering. Die Myzelsubstanz kann also die Zellulosewerte für die zersetzten Streuproben nicht nennenswert beeinflusst haben. Endlich enthielten die Myzelien eine gewisse Menge furfurolliefernder Substanzen. Dass solche Substanzen in Pilzen vorkommen, ist früher u. a. von Rege (1927) konstatiert worden, welcher fand, dass Fruchtkörper von *Coprinus* 7,82 % „Pentosane" enthielten. Infolge der Anwesenheit der Myzelien wurden deshalb auch für die furfurolliefernden Substanzen etwas zu hohe Werte erhalten.

D. Ergebnisse.

Die durch die Pilze verursachte totale Abnahme der Trockensubstanz ist aus Tab. 11 ersichtlich, welche die Gewichtsziffern für die in den ver-

Tabelle 11.

Gewichtsabnahme der Streuarten durch den Einfluss der verschiedenen Pilze.

Eingewogene Trockensubstanz je Kolben	Versuchsobjekt	Versuchszeit in Tagen	End-pH	Rest der Trockensubstanz je Kolben am Ende des Versuches: Primärwerte in g				Mittelwerte, g	Zersetzte Trockensubstanz %
Kiefernnadeln 4,63 g pH 3,9	*M. androsaceus* . .	226	3,3	3,46	3,42	3,45	3,34	3,42	26,3
	M. chordalis . . .	228	4,7	4,02	4,07	4,06	4,02	4,04	12,7
	M. fulvobulbillosus	229	4,0	3,84	3,62	3,77	3,68	3,73	19,6
	M. perforans . . .	219	3,6	3,33	3,23	3,32	3,37	3,31	28,6
	M. peronatus . . .	229	3,7	3,38	3,24	3,28	3,34	3,31	28,6
	M. putillus	223	3,6	3,16	3,10	3,04	3,01	3,08	33,6
	M. rotula	229	4,7	3,92	3,87	3,90	3,83	3,88	16,3
	M. scorodonius . .	220	4,3	3,22	3,28	2,92	3,02	3,11	32,8
Buchenlaub 4,58 g pH 4,9	*M. alliaceus* . . .	218	5,3	2,21	2,34	2,25	2,13	2,23	51,3
	M. foetidus	218	4,4	2,31	2,12	2,31	2,24	2,25	51,1
	M. putillus	178	3,6	3,06	3,06	2,93	3,06	3,03	33,9
	M. ramealis . . .	218	4,4	2,35	2,50	2,25	2,19	2,32	49,3
	M. scorodonius . .	171	4,3	3,17	3,02	2,87	2,74	2,95	35,7
Espenlaub 4,57 g pH 5,5	*M. epiphyllus* . . .	220	5,4	3,23	3,35	3,41	3,53	3,38	26,0
Stroh 4,60 g pH 5,3	*M. graminum* . . .	218	5,0	3,65	3,60	3,59	3,66	3,63	21,1
	M. oreades	219	6,6	2,08	2,10	2,13	2,07	2,10	54,4

schiedenen Reihen eingewogenen und die nach Beendigung des Versuchs in den Kolben zurückgebliebenen Trockensubstanzmengen enthält.

Die Ursache der in jeder Reihe vorhandenen Variation dürfte in erster Linie gewesen sein, dass eine gewisse Ungleichmässigkeit in der Zusammensetzung des benutzten Streumaterials nicht zu vermeiden war.

Von der zurückgebliebenen Trockensubstanz bestand, wie früher bemerkt wurde, ein gewisser Teil aus Pilzmyzelien. Der totale Abbau des Streumaterials war also in Wirklichkeit etwas grösser, als die Ziffern in Tab. 11 angeben. Die berechnete prozentuale Abnahme der totalen Trokkensubstanz kann indes als ein relativer Ausdruck der Intensität betrachtet werden, mit der die verschiedenen Pilze die Streu angriffen.

Tab. 11 enthält auch die pH-Werte, die vor und nach dem Versuch für die einzelnen Reihen erhalten wurden. Die pH-Verschiebungen wäh-

Tabelle 12.

Zersetzung des Lignins, der Zellulose und der furfurolliefernden Substanzen durch den Einfluss der verschiedenen Pilze.

Streuart	Versuchsobjekt	Lignin		Zellulose		Furfurolliefernde Substanzen	
		Ligningehalt (als L.-Th.) der zersetzten Streuarten %	zersetzt %	Zellulosegehalt der zersetzten Streuarten %	zersetzt %	Gehalt an furf.-liefernden Substanzen der zersetzten Streuarten %	zersetzt %
Kiefernnadeln	*M. androsaceus*	16,5	48,1	29,6	20,5	6,1	47,1
	M. chordalis .	26,6	1,2	27,3	12,8	7,7	20,4
	M. fulvobulb.	20,6	29,4	27,5	19,3	6,5	38,2
	M. perforans	21,9	33,3	25,0	34,7	6,0	49,7
	M. peronatus	15,8	52,0	32,2	16,1	5,5	53,5
	M. putillus. .	14,6	58,6	34,1	17,5	5,4	58,0
	M. rotula . .	21,9	21,8	28,7	12,4	7,3	28,0
	M. scorodonius	14,4	58,6	26,3	35,6	6,4	49,7
Buchenlaub	*M. alliaceus* .	14,6	72,4	5,2	84,9	12,0	66,8
	M. foetidus .	17,2	67,1	4,5	86,6	9,7	73,0
	M. putillus .	12,5	67,7	20,2	19,7	12,7	52,2
	M. ramealis .	15,5	69,4	4,9	84,9	11,7	66,2
	M. scorodonius	17,2	56,9	8,5	67,2	14,4	47,5
Espenlaub	*M. epiphyllus*	24,4	16,3	4,4	76,6	10,2	54,6
Stroh	*M. graminum*	12,4	30,1	16,3	50,6	15,1	49,0
	M. oreades .	11,5	62,5	5,0	91,3	8,8	82,8

rend des Versuchs waren im allgemeinen nicht besonders gross. Eine durchgehende Tendenz der Pilze, die Reaktion in saurer oder alkalischer Richtung zu ändern, bestand nicht.

Aus Tab. 12 geht hervor, dass sämtliche untersuchte *Marasmius*-Arten, möglicherweise mit Ausnahme von *M. chordalis*, Lignin zersetzten. Bei dem Zersetzungsversuch mit *M. chordalis* war die Abnahme des Lignins so unbedeutend, dass die Fähigkeit der Art, Lignin zu zersetzen, nicht als sicher bewiesen angesehen werden kann. Zellulose und furfurolliefernde Substanzen wurden von allen Arten zersetzt.

Der Abbau der furfurolliefernden Substanzen war in sämtlichen Reihen beträchtlich. Dass diese Substanzen zu den Bestandteilen der Streu gehören, die am leichtesten von den Mikroorganismen angegriffen werden, ist bereits früher von KLEBERG (1927), REGE (1927) und WAKSMAN & TENNEY (1927, 1928) konstatiert worden. Einen Zusammenhang zwischen der Abnahme dieser Substanzen und dem Lignin- oder Zelluloseabbau habe ich nicht feststellen können (vgl. OTTO 1916).

Von grösstem Interesse ist die von den Pilzen bewirkte Zersetzung von Lignin und Zellulose. Neben den Ziffern in Tab. 12, welche zeigen, wie die verschiedenen Arten diese Stoffe zersetzten, verdienen die numerischen Ausdrücke für das Verhältnis zwischen der Lignin- und der Zellulosezersetzung, die in Tab. 13 zusammengestellt sind, besondere Beachtung. Dieser Quotient ist ein Ausdruck für die Spezialisierung der Pilze zu Zersetzung der einen oder der andern der beiden Zellwandsubstanzen. Die Zahlenwerte desselben dürfen jedoch nicht als unter allen Umständen für die betreffenden Arten charakteristische Konstanten aufgefasst werden. Aus FALCKS (1930) und meinen eigenen Untersuchungen geht nämlich hervor, dass der genannte Quotient innerhalb gewisser Grenzen von der Natur des Substrats abhängig ist (vgl. unten). Auch die Konkurrenz mit andern Organismen dürfte ihn beeinflussen.

Von den auf **Kiefernnadeln** gezüchteten Arten verursachten *M. androsaceus*, *M. perforans*, *M. peronatus*, *M. putillus* und *M. scorodonius* eine totale Abnahme der Trockensubstanz um 26—34 %, und diese Arten dürften als intensive Streuzersetzer bezeichnet werden können. Von diesen Pilzen zersetzte *M. perforans* 33 % und die übrigen Arten 48—59 % des Lignins. *M. perforans* und *M. scorodonius* zersetzten 35—36 % der Zellulose, während *M. androsaceus*, *M. peronatus* und *M. putillus* bloss 16—21 % desselben Stoffes abbauten. Die drei letztgenannten Arten kann man als Ligninspezialisten bezeichnen. Besonders gilt dies von *M. putillus* und *M. peronatus*, für die das Verhältnis zwischen der Lignin- und der Zellulosezersetzung 3,4 bzw. 3,2 war. Diese Arten reicherten die Zellulose im Material an. Für *M. androsaceus* betrug das Verhältnis zwischen der Lignin- und der Zellulosezersetzung 2,4, und auch diese Art bewirkte eine gewisse Anreicherung von Zellulose. *M. scorodonius* und in noch höherem Grade *M. perforans* unterschieden sich von diesen Arten durch ihre relativ intensive Zellulosezersetzung. Die erste Art verursachte neben *M. putillus* die grösste totale Zersetzung und den stärksten Abbau des Lignins. *M. scorodonius* zersetzte jedoch ungefähr doppelt so viel Zellulose wie *M. putillus*, und der Quotient der Lignin- und Zellulosezersetzung war deshalb bloss 1,7. *M. perforans* endlich zersetzte Lignin und Zellulose ungefähr gleich intensiv, und der Quotient war für diese Art 1,0.

Tabelle 13.

Übersicht über die Quotienten $\frac{\text{zersetztes Lignin (\%)}}{\text{zersetzte Zellulose (\%)}}$ der verschiedenen Pilze.

Streuart	Versuchsobjekt	Quotient	Streuart	Versuchsobjekt	Quotient
Kiefern-nadeln	*M. androsaceus* .	2,4	Buchenlaub	*M. alliaceus* . . .	0,9
	M. chordalis . . .	0,1		*M. foetidus*. . . .	0,8
	M. fulvobulbillosus	1,5		*M. putillus*. . . .	3,4
	M. perforans . . .	1,0		*M. ramealis* . . .	0,8
	M. peronatus . . .	3,2		*M. scorodonius* . .	0,9
	M. putillus . . .	3,4			
	M. rotula	1,8	Espenlaub	*M. epiphyllus*. . .	0,2
	M. scorodonius . .	1,7	Stroh	*M. graminum* . .	0,6
				M. oreades	0,7

Einen bedeutend geringeren totalen Substanzverlust als die oben erwähnten Pilze bewirkten *M. chordalis*, *M. fulvobulbillosus* und *M. rotula* (13—20 %). Für *M. fulvobulbillosus* und *M. rotula* war das Verhältnis zwischen der Lignin- und der Zellulosezersetzung 1,5 bzw. 1,8. Wie oben bemerkt, kann dagegen *M. chordalis* nicht mit Sicherheit zu den Ligninzersetzern gerechnet werden. Das Wachstum von *M. chordalis* war jedoch schwach, und die Zersetzung in der Reihe mit diesem Pilz war geringer als in allen andern Reihen. Es ist deshalb möglich, dass Kiefernnadeln ein ungeeignetes Substrat für diese Art waren, und es ist nicht ausgeschlossen, dass der Pilz Lignin angegriffen hätte, wenn ein anderes Substrat verwendet worden wäre.[1]

[1] Bavendamm (1928) fand, dass solche holzzersetzenden Pilze, welche sowohl Lignin als Zellulose abbauen, sich anders gegen Gerbstoffe verhalten als Pilze, die nur Zellulose angreifen. Die ersteren bilden bei Züchtung auf Agarplatten, welche Tannin oder Gallussäure enthalten, einen schwarzbraunen Hof, d. h. eine dunkle, von oxydierendem Enzym hervorgerufene Oxydationszone, während Pilze des letztgenannten Typus keinen solchen Hof bilden. Davidson, Campbell & Blaisdell (1938) untersuchten eine sehr grosse Anzahl holzzersetzender Pilze und konnten im wesentlichen Bavendamms Regel bestätigen. Auch Robak (1942) fand, dass diese Regel weitgehende Geltung hat.

Die *Marasmius*-Arten wurden von mir auf einem Substrat von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

Glykose	5 g	$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5 g
NH_4Cl	0,5 g	Malzextrakt	2,5 g
KH_2PO_4	0,25 g	Agar	15 g
K_2HPO_4	0,25 g	H_2O (dest.)	1000 ccm

Hierzu wurde Gerbsäure („reinst", D. A. B. 6, Schering-Kahlbaum) in der Konzentration von 0,05 % gesetzt. Sämtliche 14 Arten bildeten einen deutlichen Hof auf dem gerbsäure-

Bei den Zersetzungsversuchen mit **Buchenlaub** ergaben sich durchweg höhere Ziffern sowohl für die totale Trockensubstanzabnahme als für die Zersetzung der einzelnen Bestandteile. *M. alliaceus*, *M. foetidus* und *M. ramealis* zeigten hier weitgehende Übereinstimmung in Intensität und Art der Zersetzung. Ungefähr die Hälfte des Streumaterials wurde zersetzt (49—51 %). Das Lignin nahm um 67—72 %, die Zellulose um 85—87 % ab. Das Verhältnis zwischen der Lignin- und der Zellulosezersetzung war bei diesen Arten 0,8—0,9.

Auch *M. scorodonius* und der typische Nadelpilz *M. putillus* wurden auf Buchenlaub gezüchtet. Diese Reihen wurden indes nach etwas kürzerer Zeit abgebrochen als die übrigen. Trotzdem war die totale Zersetzung des Buchenlaubes durch diese Arten (34 bzw. 36 %) ungefähr ebenso gross wie die totale Zersetzung von Nadeln durch dieselben Arten (34 bzw. 33 %). Auf Buchenlaub zersetzte *M. putillus* 68 % Lignin und 20 % Zellulose (entsprechende Ziffern in der Kiefernnadelreihe 59 bzw. 18 %) und *M. scorodonius* 57 % Lignin und 67 % Zellulose (Kiefernnadelreihe: 59 bzw. 36 %).

Berücksichtigt man, dass die Versuchszeit bei der Buchenlaubreihe $1\,^1/_2$ Monate kürzer war als bei der Kiefernnadelreihe, so kann man aus diesen Resultaten folgende Schlüsse ziehen:

Es ist klar, dass die Kiefernnadeln dem Angriff der Pilze grösseren Widerstand leisteten als das Buchenlaub.

M. scorodonius, welcher sowohl Zellulose als Lignin intensiv zersetzt, baute in der Buchenlaubreihe fast doppelt so viel Zellulose ab wie in der Kiefernnadelreihe. Das Verhältnis zwischen der Lignin- und der Zellulosezersetzung war in der ersteren Reihe 0,9 und in der letzteren 1,7. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass besonders die Buchenlaubzellulose leichter angreifbar war als die Kiefernnadelzellulose.

Dass *M. putillus* ein extremer Ligninspezialist ist, wird durch diesen Versuch bestätigt. Das Verhältnis zwischen der Lignin- und der Zellulosezersetzung war in den beiden Reihen ein und dasselbe, nämlich 3,4. Dies kann so gedeutet werden, dass der Pilz ein so schwacher Zellulosezersetzer ist, dass er, obgleich die Buchenlaubzellulose leichter angreifbar war als die Kiefernnadelzellulose, die erstere nicht in nennenswert höherem Grade ausnutzen konnte als die letztere.

Es ist ja eine allgemeine Erfahrung, dass die Nadelstreu in der Natur langsamer vermodert als die Laubstreu. Nach mehreren Autoren (Wollny 1897, Koch 1914, Kleberg 1927 und Němec 1927) soll der Gehalt der

haltigen Substrat. Besonders zu beachten ist, dass sich *M. chordalis* also in dieser Beziehung ebenso verhielt wie die übrigen Arten. Dies spricht dafür, dass auch diese Art die Fähigkeit besitzt, wenigstens unter gewissen Umständen Lignin abzubauen.

Nadeln an Harzen und ätherischen Ölen hemmend auf die zersetzenden Organismen wirken. Die Zersetzungsgeschwindigkeit ist indes auch vom Gehalt der Streu an assimilierbarem Stickstoff abhängig (Waksman 1927, Waksman & Tenney 1927, 1928), und dieser kann in Material von verschiedenen Standorten sehr verschieden hoch sein (Hesselman 1926). Da der Stickstoffaktor hier nicht untersucht wurde, lässt sich nichts weiter über die Ursache der grösseren Widerstandskraft der Nadeln sagen.

M. epiphyllus, welcher auf **Espenlaub** gezüchtet wurde, bewirkte einen totalen Substanzverlust von 26 %. Die Zellulosezersetzung (77 %) war äusserst kräftig und im Verhältnis zu der totalen Trockensubstanzabnahme grösser als für irgendeine der übrigen Arten. Gleichzeitig war indes die Ligninzersetzung nicht grösser, als dass das Lignin etwas im Material angereichert wurde.

Die auf **Stroh** gezüchteten Graspilze *M. graminum* und *M. oreades* verursachten einen totalen Substanzverlust von 21 bzw. 54 %. Die von der letzteren Art herbeigeführte totale Substanzabnahme war die grösste in dieser Untersuchung. Die beiden Pilze zersetzten 30 bzw. 63 % des Lignins und 51 bzw. 91 % der Zellulose. Besonders *M. oreades* griff also die beiden Bestandteile sehr intensiv an. Der Quotient für die Lignin- und Zellulosezersetzung war für *M. graminum* 0,6 und für *M. oreades* 0,7.

Es ist von Interesse, den Lignin- und Zelluloseabbau bei den *Marasmius*-Arten und bei den holzzersetzenden Pilzen zu vergleichen.

Vor allem durch R. Hartigs grundlegende Arbeiten aus den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts sind die wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Haupttypen der Holzzersetzung durch Pilze, der Braunfäule und der Weissfäule, klargestellt worden. Auf Grund der Resultate Hartigs und anderer Forscher nahm man allmählich allgemein an, dass Braunfäule mit Zellulosezersetzung und Weissfäule mit Ligninzersetzung zu identifizieren sei (Literaturangaben bei Bavendamm 1936). Falcks und Campbells Untersuchungen (Falck 1926, Falck & Haag 1927, Campbell 1932 a, b) haben indes ergeben, dass ligninzersetzende Pilze immer in grösserem oder geringerem Umfang auch Zellulose angreifen.

Campbell, der unter Weissfäule erzeugenden Pilzen alle ligninzersetzenden Holzpilze versteht, fand, dass diese hinsichtlich der relativen Intensität der Lignin- und Zellulosezersetzung sehr verschiedene Typen umfassen, die sich in drei Gruppen einteilen lassen (Campbell 1932 a): Zu der ersten Gruppe gehören solche Pilze, die im früheren Stadium des Zersetzungsprozesses hauptsächlich Lignin angreifen, zu der zweiten solche, die in dem entsprechenden Stadium vor allem Zellulose zersetzen, und zur dritten endlich solche, welche diese beiden Bestandteile gleichzeitig angreifen.

Bei der oben vorgenommenen Prüfung der in den Tabellen 11 und 12 zusammengestellten Versuchsresultate fanden wir, dass auch die *Marasmius*-Arten hinsichtlich der relativen Intensität der Lignin- und Zellulosezersetzung verschiedene Typen umfassen. Diese Arten in CAMPBELLS drei Gruppen von Weissfäule erzeugenden Pilzen einzuordnen, ist vielleicht schwierig, da die Zersetzung in meinen Versuchen bei mehreren Pilzen ohne Zweifel weiter fortgeschritten ist, als CAMPBELLS „früherem Stadium" (early stages) des Zersetzungsprozesses entspricht. Mit Ausnahme von *M. chordalis* scheinen indes alle untersuchten Arten die grösste Übereinstimmung mit CAMPBELLS dritter Gruppe von Weissfäule erzeugenden Pilzen aufzuweisen, welche diejenigen enthält, die von Anfang an sowohl Lignin als Zellulose angreifen, wenn auch in wechselnden Proportionen. Vielleicht nähert sich jedoch *M. epiphyllus* CAMPBELLS zweiter Gruppe, deren Mitglieder dadurch charakterisiert sind, dass die Ligninzersetzung erst allmählich eintritt, so dass anfangs eine gewisse Anreicherung von Lignin stattfindet.

Endlich will ich etwas auf die wichtige Frage eingehen, inwieweit die erhaltenen Resultate Schlussfolgerungen hinsichtlich der Bedeutung der *Marasmius*-Arten für die Stoffumwandlung im Waldboden gestatten, obgleich sich diesbezügliche Schlüsse nur mit grösster Vorsicht ziehen lassen.

Ein Teil dieser Arten, z. B. *M. androsaceus*, *M. perforans*, *M. peronatus* und *M. scorodonius*, gehören zu den allgemeinsten Hutpilzen unserer Nadelwälder, wo sie besonders reichlich auf angehäufter Nadelstreu auftreten. In Laubwäldern sind z. B. *M. alliaceus*, *M. epiphyllus*, *M. peronatus*, *M. ramealis* und *M. scorodonius* sehr gewöhnlich. Darf man überhaupt annehmen, dass eine reichliche Fruchtkörperbildung einer grossen Menge vegetativem Myzel entspricht, so dürfte man damit rechnen können, dass Myzelien der *Marasmius*-Arten reichlich im Waldboden vorkommen.

Aus den Versuchen ist hervorgegangen, dass diese Pilze, wenn sie ein Streumaterial durchwachsen, in der Regel das Lignin und die Zellulose in demselben stark zersetzen. Die Bedingungen in der Natur sind indes in vielen Beziehungen sehr verschieden von denen, die bei einem unter kontrollierten Verhältnissen ausgeführten Experiment herrschen.

Zuerst ist darauf hinzuweisen, dass die streuzersetzenden Hutpilze in der Natur der Konkurrenz rasch wachsender Bakterien und niedriger Pilze ausgesetzt sind, die sich vor allem auf den weniger widerstandsfähigen Komponenten des Streumaterials entwickeln, d. h. den wasserlöslichen organischen Stoffen, den Hemizellulosen usw. Deshalb ist es wahrschein-

lich, dass sie unter diesen Umständen einseitiger darauf angewiesen sind, ihren Energiebedarf dadurch zu decken, dass sie die widerstandsfähigeren Bestandteile der Streu angreifen (vgl. WAKSMAN 1931).

Andererseits dürften die Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse in der Natur durchschnittlich in unserem Klima nicht so günstig sein wie bei den genannten Versuchen, und der gesamte Abbau durch die Pilze dürfte infolgedessen unter natürlichen Bedingungen etwas weniger intensiv sein.

Auch wenn der Lignin- und Zelluloseabbau in der Natur infolge des Einflusses gewisser Faktoren, wie Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse, etwas weniger intensiv sein sollte als bei den von mir ausgeführten Versuchen, muss man es doch wegen des allgemeinen Vorkommens der *Marasmius*-Arten für äusserst wahrscheinlich halten, dass diese eine quantitativ wichtige Rolle beim Abbau des Lignins und der Zellulose spielen. Besonders bedeutsam ist hier die von den Pilzen bewirkte Ligninzersetzung. Das Lignin ist nämlich einer der wichtigsten der Stoffe, welche zur Bildung der schwer zersetzbaren Humusstoffe führen (WAKSMAN 1936; hier auch zahlreiche Literaturhinweise). Durch Abbau des Lignins der Streu wirken daher die *Marasmius*-Arten der Entstehung solcher Stoffe entgegen. Wie oben bemerkt, waren bisher nur wenige Bodenorganismen als Ligninzersetzer bekannt.

Bevor man eine vollständigere Kenntnis von dem Vermögen der verschiedenen Bodenorganismen zur Ligninzersetzung gewonnen hat, dürfte es nicht möglich sein zu entscheiden, inwieweit die Ligninzersetzung und die Humusbildung in verschiedenen Pflanzengesellschaften durch die Anzahl vorkommender ligninzersetzender Arten bedingt ist. FALCKS Annahme, dass die Nadelwälder arm an ligninzersetzenden Pilzarten seien und dass dies die Ursache der in diesen Wäldern gewöhnlichen Rohhumusbildung sei (FALCK 1930), wird einstweilen nicht durch experimentelle Tatsachen gestützt und bis zu gewissem Grade durch die oben mitgeteilten Resultate widerlegt. Aus diesen geht indes hervor, dass man bei Beurteilung der Bodenprozesse damit rechnen muss, dass verschiedene Streuarten dem Angriff von Zersetzungsorganismen verschieden starken Widerstand leisten, was früher ausser von FALCK (l. c.) auch von WAKSMAN & TENNEY (1928) sowie MELIN (1930) u. a. konstatiert worden ist.

III. Experimentelle Untersuchungen über die Bedingungen für das Wachstum der *Marasmius*-Arten in synthetischen Nährlösungen.

A. Methodik.

Bei sämtlichen Versuchen wurden Erlenmeyerkolben aus Jenaer Geräteglas 20 mit einem Volumen von 100 ccm verwendet. Die Kolben wurden vor jedem Versuch mit Bichromatschwefelsäure behandelt (höchstens eine Stunde). Hierauf wurden sie gespült und blieben 24 Stunden mit Leitungswasser gefüllt stehen, worauf sie mit destilliertem Wasser gespült wurden. In gewissen Fällen wurden die Kolben schliesslich mit strömendem Wasserdampf behandelt. Jeder Kolben enthielt bei sämtlichen Versuchen anfangs 20 ccm Nährlösung. Als Pfropfen diente chemisch reine Baumwolle.

In der Regel wurde Wasser verwendet, das einmal in einer elektrisch erhitzten Apparatur mit verzinntem Kessel und Kühler destilliert worden war. In gewissen Fällen wurde dieses Wasser weiterhin durch Umdestillieren in einem Destillationsapparat nach Ramberg (1932, S. 133) mit elektrisch erhitztem, verzinntem Kessel und Kühlrohr aus Quarz gereinigt. Das so erhaltene Wasser wird im folgenden als 'zweimal destilliertes Wasser' bezeichnet. Um Wasser mit noch geringerem Gehalt an Metallen herzustellen, destillierte ich in gewissen Fällen das zweimal destillierte Wasser nochmals in einem Destillationsapparat nach Ramberg (1932, S. 131) um, der aus Jenaer Geräteglas 20 angefertigt war, mit Ausnahme des Kühlrohrs, das auch in diesem Fall aus Quarz bestand. Das so erhaltene Wasser wird im folgenden 'dreimal destilliertes Wasser' genannt.

Bei der Zubereitung der Nährlösungen wurden in der Regel Schering-Kahlbaums Chemikalien verwendet, wenn möglich von der Qualität „*pro analysi*". Das NH_4-Tartrat wurde von der Firma Riedel & de Haen erhalten. Die verwendete Glykose war wasserfrei. Das Asparagin wurde in Form von Monohydrat benutzt. Folgende Wuchsstoffpräparate wurden benutzt:

Aneurin (Vitamin B_1) als Chlorid (Firma Merck),
2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin als Chlorid (Firma Merck),
4-Methyl-5-β-oxyäthyl-thiazol (Firma Merck),
Meso-inosit (Schering-Kahlbaum),
Biotin-methylester (hergestellt in Prof. Kögls Laboratorium in Utrecht).

Wenn nichts anderes gesagt ist, wurden die Wuchsstoffpräparate den Nährlösungen vor dem Autoklavieren zugesetzt (vgl. S. 72).

Die Lösungen wurden durch Autoklavieren bis zu einem Überdruck von 1,2 kg je qcm sterilisiert. (Die Erhitzung wurde abgebrochen, sobald dieser Druck erreicht war.) Pipetten und Petrischalen wurden durch Erhitzen im Thermostaten auf 150° C sterilisiert.

Die pH-Bestimmungen erfolgten in der Regel mit einer Chinhydronelektrode, wobei als Vergleichselektrode eine gesättigte Kalomelelektrode diente.

Wenn das pH am Ende der Versuche für Reihen bestimmt wurde, die mehrere Kolben mit derselben Lösung umfassten, wurde die Bestimmung an der zusammengegossenen Flüssigkeit vorgenommen (vgl. Fries 1938, S. 12).

Über die Impfmethodik sei Folgendes bemerkt: Es ist ja von vornherein wahrscheinlich, dass Pilze, deren Myzelien in der Natur auf gut durchlüfteter Streu wachsen, in ihrem Wachstum stark von guter Sauerstoffzufuhr abhängig sind. Orientierende Versuche ergaben auch, dass schwimmende Myzelien gewisser *Marasmius*-Arten um das Mehrfache rascher wuchsen als submerse Myzelien derselben Arten. Deshalb habe ich bei meinen experimentellen Untersuchungen die Nährlösungen durchweg mit schwimmenden Myzelien geimpft (vgl. Reitsma 1932, S. 470). Diese Impfmethode ist übrigens in mehreren vom hiesigen Botanischen Institut herausgegebenen Arbeiten angewandt worden (Melin u. Mitarb. 1939, 1940, 1941, 1942). Besonders eingehend ist die Wachstumsgeschwindigkeit der höheren Pilze bei gutem und schlechtem Luftzutritt von Modess (1941) untersucht worden, welcher feststellte, dass die Myzelien mehrerer Arten bedeutend rascher wuchsen, wenn sie schwimmend, als wenn sie submers gezüchtet wurden.

Die Impfung erfolgte, wenn nichts anderes angegeben ist, von Kulturen der betreffenden Pilze auf Malzagar in Petrischalen. In gewissen Fällen wurde „synthetischer" Agar verwendet, dessen Zusammensetzung bei den betreffenden Versuchen beschrieben ist. Die Impfstücke wurden mit einem sterilen Skalpell aus der ca. 2 mm dicken Agarplatte ausgeschnitten und hatten eine Fläche von ungefähr 1,5 × 1,5 mm.

Die Kulturen wurden bei 25° C aufbewahrt.

Wenn die Versuchszeit mehr als zwei Monate betrug, wurden ungefähr jeden 50. Tag 10 ccm steriles destilliertes Wasser je Kolben als Ersatz für verdunstetes Wasser zugesetzt.

Am Ende der Versuche wurden die Myzelien in destilliertes Wasser gelegt, danach mit Filtrierpapier abgesaugt und schliesslich in Wägefläschchen bei 100° getrocknet. Nach Abkühlung wurden die Myzelien direkt auf der Analysenwaage gewogen.

Die Werte des Myzeltrockengewichts sind Mittelwerte von gewöhnlich 6, bisweilen 4 oder 8 Primärwerten. Hauptsächlich um dem Leser eine Vorstellung von der Streuung zu geben, habe ich in mehreren Fällen den mittleren Fehler des Mittelwerts angegeben, der berechnet ist nach der Formel:

$$\varepsilon = \sqrt{\Sigma (m - M)^2 : N (N - 1)}.$$

Zu Beginn meiner Untersuchungen benutzte ich ziemlich einfache Nährlösungen. Im Verlauf der Arbeit konnten diese indes ergänzt werden, so dass sie immer besser den Bedürfnissen der Pilze entsprachen. Zwecks Vermeidung von Wiederholungen gebe ich hier die Zusammensetzung zweier Nährlösungen an, die oft zur Anwendung kamen. Von diesen ist besonders Lösung B — eventuell nach Korrektion des pH, und für aneurinbedürftige Arten mit 50 γ Aneurin je Liter ergänzt — meinen Erfahrungen nach eine gute Nährlösung für Pilze des physiologischen Typus, den die *Marasmius*-Arten repräsentieren.

Nährlösung A:		
Glykose	20	g
NH_4-Tartrat	5	g
KH_2PO_4	1	g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5	g
$FeCl_3$-Lösung (Fe-Konz. 1/500)	0,5	ccm
$ZnSO_4$-Lösung (Zn-Konz. 1/500)	0,5	ccm
H_2O (dest.)	1000	ccm
pH (nach Autoklavieren)	5,5	

Nährlösung B:		
Glykose	20	g
NH_4-Tartrat	5	g
KH_2PO_4	1	g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5	g
$FeCl_3$-Lösung (Fe-Konz. 1/500)	0,5	ccm
$ZnSO_4$-Lösung (Zn-Konz. 1/500)	0,5	ccm
$MnCl_2$-Lösung (0,1-mol.)	0,5	ccm
$CaCl_2$-Lösung (0,1-mol.)	5	ccm
H_2O (dest.)	995	ccm
pH (nach Autoklavieren)	5,5	

B. Das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen.

Zu Beginn meiner Untersuchungen führte ich unter anderm gewisse vorbereitende Studien über die Fähigkeit der Pilze aus synthetische Nährlösungen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen zu assimilieren. Über diese

Versuche, bei denen den Nährlösungen auch Hefeextrakt zugesetzt wurde, will ich nicht näher berichten, sondern bloss erwähnen, dass sich unter den Kohlenhydraten Glykose, Saccharose, Maltose und Stärke als die besten Kohlenstoffquellen erwiesen. Unter den käuflichen Präparaten dieser Kohlenhydrate dürfte das Glykosepräparat das reinste sein. Bei den fortgesetzten Untersuchungen benutzte ich deshalb durchweg Glykose als Kohlenstoffquelle in meinen Nährlösungen.

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, freien und in verschiedener Weise gebundenen Stickstoff zu assimilieren, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, und man hat verschiedene, meist stark schematische Einteilungen dieser Organismen nach ihrer Stickstoffassimilation vorgeschlagen (Fischer 1903, S. 96, Benecke 1907, S. 401, Benecke & Jost 1924, S. 307, Robbins 1937). Die Untersuchungen über das Vermögen der Mikroorganismen zur Ausnutzung verschiedener Stickstoffquellen sind jedoch in vielen Fällen ausgeführt worden, ohne dass man gebührende Rücksicht auf ihren Bedarf an Wuchsstoffen oder ihre Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums nehmen konnte, und manche Resultate auf diesem Gebiet müssen deshalb als unsicher betrachtet werden.

Unter den Hymenomyzeten hat man besonders gewisse mykorrhizabildende und holzzersetzende Arten studiert. Melin (1925) untersuchte Mykorrhizabildner bei Fichte und Kiefer. Die Pilze wurden in synthetischen Nährlösungen gezüchtet. Durch Zusatz von „Phosphatiden" von Samen wurde ihr Bedarf an organischen Wachstumsstoffen berücksichtigt. Ammoniumsalze konnten von sämtlichen, Nitrate dagegen nur von gewissen der untersuchten Pilze assimiliert werden. Gewisse Aminosäuren, Nukleinsäuren usw. waren gute Stickstoffquellen. Holländer (1932) untersuchte Hymenomyzeten, die von Orchideenmykorrhizen isoliert worden waren. Auf Substraten mit hochmolekularen organischen Stickstoffverbindungen erzielte er gutes Wachstum, während die anorganischen Stickstoffsalze bedeutend schlechter ausgenutzt werden konnten (wahrscheinlich, weil die Pilze im letzteren Fall an Wuchsstoffmangel litten).

Angaben über die Fähigkeit verschiedener holzzersetzender Hymenomyzeten zur Ausnutzung verschiedener Arten von Stickstoffquellen finden sich unter anderm bei Wolpert (1924), Reitsma (1932) und Robak (1942). Diese Autoren fanden, dass sich die Pilze besser auf organischen Stickstoffverbindungen als auf anorganischen Stickstoffsalzen entwickelten. Eine wesentlich beitragende Ursache ihrer Resultate dürfte gewesen sein, dass die von ihnen verwendeten organischen Stickstoffverbindungen wuchsstoffhaltig waren.

Da die Kenntnis von den Forderungen der Pilze in bezug auf die Stick-

stoffquelle von grosser Bedeutung ist, wenn es sich darum handelt, möglichst optimale Nährlösungen zusammenzusetzen, widmete ich dieser Frage schon bei Beginn meiner Untersuchungen eine gewisse Aufmerksamkeit. Ich übergehe indes hier diese ersten orientierenden Versuche, die nur mit wenigen Arten angestellt wurden, und berichte statt dessen über einen mit sämtlichen Arten ausser *Marasmius oreades* ausgeführten Versuch, wobei eine Nährlösung verwendet wurde, bei deren Zusammensetzung grösstmögliche Rücksicht auf den Bedarf der Pilze an Wuchsstoffen und anorganischen Salzen sowie auf ihre Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration genommen wurde. Als Stickstoffquellen dienten KNO_3, NH_4Cl und Asparagin. Diese Stoffe wurden in solchen Mengen zugesetzt, dass jede Lösung 0,28 g Stickstoff je Liter enthielt.

Versuch 1. Das Wachstum der Pilze auf verschiedenen Stickstoffquellen (Tab. 14).

Grundlösung:

Glykose	10	g	$CaSO_4 . 2H_2O$	0,1	g
KH_2PO_4	0,25	g	$MnSO_4 . 4H_2O$	0,01	g
K_2HPO_4	0,25	g	Aneurin	50	γ
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,5	g	H_2O	1000	ccm
$FeCl_3$-Lösung (Fe-Konz. 1/500)	0,5	ccm			
$ZnSO_4$-Lösung (Zn-Konz. 1/500)	0,5	ccm			

Reihen: a) Kein Stickstoffzusatz.
b) 2,02 g KNO_3 je Liter.
c) 1,07 g NH_4Cl je Liter.
d) 1,50 g Asparagin je Liter.

Für die säureempfindlicheren Arten (vgl. S. 108) wurde die oben beschriebene Grundlösung mit primärem + sekundärem Phosphat verwendet, für die weniger empfindlichen dieselbe Lösung nur mit primärem Phosphat, und zwar 0,5 g je Liter. Jedem der Kolben, die mit *M. androsaceus* geimpft werden sollten, wurden 10 mγ Biotin zugesetzt. 4 Parallelkolben.

Das pH der Lösungen bei Beginn des Versuches war:

1. (Prim. und sek. Phosphat) pH 6,3.
2. (Nur prim. Phosphat) pH 4,4.

Ohne Stickstoffzusatz war das Wachstum bei sämtlichen Arten ganz gering. Nitratstickstoff konnte nur von *M. fulvobulbillosus* assimiliert werden. Mit NH_4Cl oder Asparagin als Stickstoffquelle zeigten dagegen sämtliche Arten mehr oder minder gutes Wachstum.

Für mehrere Arten, besonders in der Gruppe 1, war Asparagin eine vorteilhaftere Stickstoffquelle als das Ammoniumsalz. Eine wichtige Ursache hiervon war sicher, dass das Wachstum in der Lösung mit dem Ammoniumsalz eine erhebliche Steigerung der Wasserstoffionenkonzentration bewirkte, während die pH-Verschiebung in der Asparaginreihe durchgehend geringer war.

Tabelle 14.

Das Wachstum der Pilze auf verschiedenen Stickstoffquellen (Versuch 1).

Versuchsobjekt	Versuchszeit in Tagen	Kein Stickstoffzusatz		KNO_3		NH_4Cl		Asparagin	
		Ernte mg	End-pH	Ernte mg	End-pH	Ernte mg	End-pH	Ernte mg	End-pH
Gruppe 1.									
M. alliaceus . .	38	1,7 ± 0,1	5,0	2,5 ± 0,3	4,9	9,4 ± 2,1	3,4	15,7 ± 1,8	5,1
M. chordalis . .	38	2,4 ± 0,4	5,6	1,9 ± 0,1	5,5	7,7 ± 0,0	3,5	17,4 ± 0,7	6,1
M. epiphyllus. .	15	2,0 ± 0,3	6,3	2,3 ± 0,5	6,2	11,4 ± 0,4	3,7	31,7 ± 1,6	4,9
M. fulvobulb. C .	38	2,5 ± 0,0	5,2	7,8 ± 0,4	5,1	15,7 ± 2,5	3,2	20,8 ± 1,2	4,3
M. graminum. .	15	0,6 ± 0,1	6,2	0,5 ± 0,0	6,3	30,3 ± 1,0	3,5	127,5 ± 1,4	5,7
M. ramealis C .	17	1,5 ± 0,1	4,5	1,0 ± 0,2	5,1	9,4 ± 1,6	3,7	8,4 ± 1,1	3,9
M. rotula C . .	15	1,1 ± 0,1	6,5	0,6 ± 0,0	6,3	8,4 ± 0,1	3,9	16,5 ± 0,5	6,3
Gruppe 2.									
M. androsaceus C	18	1,5 ± 0,3	3,7	1,0 ± 0,4	3,7	10,3 ± 0,2	2,9	14,5 ± 0,6	3,2
M. foetidus A. .	17	1,1 ± 0,0	3,0	0,8 ± 0,1	3,4	5,6 ± 0,3	2,7	6,6 ± 0,3	2,9
M. perforans A .	38	1,9 ± 0,3	3,6	1,0 ± 0,1	3,8	21,2 ± 1,0	2,6	13,5 ± 0,3	3,7
M. peronatus A .	18	0,3 ± 0,0	3,8	0,3 ± 0,0	4,0	3,4 ± 0,2	3,5	4,3 ± 0,3	4,0
M. putillus. . .	39	0,8 ± 0,0	3,5	0,6 ± 0,1	3,5	23,2 ± 0,5	2,5	5,6 ± 0,3	4,3
M. scorodonius A	17	2,0 ± 0,2	3,9	1,9 ± 0,2	4,1	13,3 ± 0,3	3,0	14,5 ± 0,3	3,8

Anfangs-pH bei Gruppe 1: 6,3.
» » 2: 4,4.

Dass die Wasserstoffionenkonzentration zunimmt, wenn ein Ammoniumsalz einer starken Säure als N-Quelle dient, und dass dies darauf beruht, dass diese Säure in der Lösung angereichert wird, weil die NH_4-Ionen vom Organismus rascher aufgenommen werden als die Anionen des Salzes, fanden bereits Butkewitsch 1902 und Nikitinsky 1904. Dasselbe ist dann von verschiedenen anderen Forschern festgestellt worden.

Auch im Zusammenhang mit dem Wachstum der Pilze in der Asparaginreihe verschob sich indes das pH in den meisten Fällen in saurer Richtung. Die Ursache hiervon war vermutlich, dass die Pilze organische Säuren bildeten. Es ist von Interesse, zu konstatieren, dass grosse Unterschiede zwischen den einzelnen Arten in dieser Hinsicht bestanden. So wuchs *M. rotula* bei pH 6,3, ohne die Wasserstoffionenkonzentration zu verändern, und die von *M. chordalis* und *M. graminum* verursachte pH-Verschiebung war ganz unbedeutend. Unter den Pilzen von Gruppe 2 bewirkten *M.*

putillus und *M. scorodonius* die verhältnismässig geringste Reaktionsveränderung. Kräftige Säurebildner waren *M. foetidus*, *M. androsaceus* und *M. ramealis*. Die übrigen Arten nahmen eine Mittelstellung ein.

Ein Versuch, bei dem sechs *Marasmius*-Arten auf verschiedenen organischen Stickstoffquellen gezüchtet wurden, sei hier in aller Kürze erwähnt. Versuchsobjekte waren *M. alliaceus*, *M. foetidus*, *M. graminum*, *M. ramealis*, *M. rotula* und *M. scorodonius*. Als Stickstoffquellen dienten Glykokoll, α-Alanin, Leuzin, Asparagin, Harnstoff und Azetamid.

Es zeigte sich, dass die organischen Verbindungen von sehr wechselndem Wert als Stickstoffquellen waren. Glykokoll konnte nicht als Stickstoffquelle für *M. ramealis* und *M. rotula* dienen, ermöglichte aber gutes Wachstum für *M. graminum*. α-Alanin war eine ziemlich gute Stickstoffquelle für sämtliche Arten. Leuzin war anwendbar als Stickstoffquelle, aber das Wachstum war durchgehend langsamer als in der Reihe mit α-Alanin. Asparagin und Harnstoff ermöglichten gutes Wachstum. Zu Azetamid endlich verhielten sich die untersuchten Arten sehr verschieden. *M. rotula* und *M. scorodonius* zeigten gutes Wachstum in Gegenwart dieses Stoffes, während *M. graminum* und *M. ramealis* ihn nicht als Stickstoffquelle verwerten konnten. Es scheinen also grosse Unterschiede zwischen den einzelnen Arten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung der Enzyme zu bestehen, die für die Freimachung von Stickstoff aus verschiedenen Aminosäuren und Amiden erforderlich sind.

C. **Der Einfluss von Wuchsstoffen.**

Eine der wichtigsten Fragen, vor die ich mich bei Beginn meiner Untersuchungen über die Bedingungen für das Wachstum der *Marasmius*-Arten in definierten synthetischen Nährlösungen gestellt sah, war: Können diese Pilze überhaupt eine synthetische Nährlösung assimilieren, die bloss Zucker und gewöhnliche Nährsalze enthält, oder fordern sie für ihr Wachstum auch einen Zusatz eines oder einiger hochaktiver organischer Stoffe?

Der Bedarf der Mikroorganismen an hochaktiven organischen Stoffen oder *Wuchsstoffen* ist mit ständig zunehmender Intensität untersucht worden, seitdem Wildiers (1901) entdeckt hatte, dass Hefepilze, um sich in einer synthetischen Nährlösung entwickeln zu können, einen Zusatz kleiner Mengen einer organischen Substanz brauchen, welche Wildiers 'Bios' nannte. Wegen der Forschungsergebnisse über die Zusammensetzung des Bioskomplexes verweise ich auf die Übersichten, die v. Hasselt (1935), Fries (1938) und Schopfer (1939) gegeben haben. Hier sei nur daran erinnert, dass Bios, wie sich herausgestellt hat, aus mehreren Komponenten besteht, von denen bisher folgende identifiziert worden sind: Meso-inosit,

Biotin und Aneurin (Vitamin B_1) sowie β-Alanin, l-Leuzin und gewisse andere Aminosäuren. Im Jahre 1940 konnten GYÖRGY und Mitarbeiter (DU VIGNEAUD u. Mitarb. 1940, GYÖRGY u. Mitarb. 1940) nachweisen, dass Biotin höchstwahrscheinlich mit Vitamin H identisch ist.

Der Bedarf eines oder mehrerer Wuchsstoffe ist kennzeichnend für Organismen mit ganz verschiedener systematischer Stellung. Unter den Pilzen ist besonders oft ein Aneurinbedarf festgestellt worden. Der Pilz, bei dem zuerst konstatiert wurde, dass er zur Entwicklung in einer synthetischen Nährlösung Aneurin braucht, war die Mucorazee *Phycomyces Blakesleeanus* (SCHOPFER 1934 a, BURGEFF 1934), und diese Art ist dann bei zahlreichen Untersuchungen über die Wirkung des Aneurins verwendet worden. Eine besonders bedeutsame Arbeit auf diesem Gebiet ist von SCHOPFER und seinen Mitarbeitern geleistet worden. Schon 1935 wies SCHOPFER nach, dass die Myzelbildung bei *Phycomyces Blakesleeanus* in der Weise von der vorhandenen Menge Aneurin abhängig ist, dass eine gewisse Menge Aneurin bloss zur Bildung einer gewissen Menge Myzel reicht (SCHOPFER 1935 b). Das Aneurin wirkt m. a. W. quantitativ. Gewisse andere Ergebnisse von SCHOPFERS Untersuchungen werden weiter unten näher berührt werden.

Unter den Hymenomyzeten wurden vor allem zwei ökologisch getrennte Gruppen auf ihren Aneurinbedarf hin untersucht: die holzzersetzenden Pilze und die Mykorrhizapilze. FRIES (1938) widmete einer Anzahl holzzersetzender Polyporazeen eine eingehende Untersuchung und konstatierte, dass diese Pilze in der Regel eine synthetische Nährlösung nicht ohne Zusatz von Aneurin assimilieren konnten. MELIN und seine Mitarbeiter (1939, 1940, 1941, 1942) studierten den Einfluss von Aneurin auf mykorrhizabildende Hymenomyzeten bei Kiefer und Fichte. Auch von diesen Pilzen brauchten die meisten Aneurin, um sich in einer synthetischen Nährlösung entwickeln zu können.

Während die Literatur über die Bedeutung des Aneurins für die Mikroorganismen ausserordentlich umfangreich ist, war der Einfluss des Biotins auf diese Organismen bloss Gegenstand relativ weniger Untersuchungen. Dies beruht darauf, dass Biotin bis vor kurzem nicht in chemisch reiner Form zu haben war.

KÖGL und seine Mitarbeiter waren die ersten, denen es gelang, Biotin in reiner Form herzustellen (KÖGL 1935, 1937; KÖGL & TÖNNIS 1936). Bei ihrer Isolierungsarbeit benutzten sie als Testobjekt *Saccharomyces cerevisiae*, Rasse M, der zur Assimilation einer synthetischen Nährlösung einen Zusatz von Biotin fordert.

Der parasitische Askomyzet *Nematospora gossypii* konnte von FARRIES & BELL (1930) nur dann zum Wachstum auf synthetischem Substrat gebracht werden, wenn dieses mit Pepton oder gewissen Proteinhydro-

lysaten versetzt wurde. Buston & Pramanik (1931) gelang der Nachweis, dass der für den Pilz notwendige akzessorische Faktor aus zwei Komponenten besteht, von denen die eine Meso-inosit ist, und Buston & Kasinathan (1933) stellten ein konzentriertes Präparat der andern Komponente her. Im Jahre 1937 konstatierten Kögl & Fries, dass diese andere Komponente identisch mit Biotin ist. Dieselben Autoren wiesen auch nach, dass *Lophodermium pinastri* eine synthetische Nährlösung nur ausnutzen kann, wenn dieselbe sowohl Aneurin als Biotin enthält. Zu demselben physiologischen Typus wie der letztgenannte Pilz gehören auch *Valsa pini*, *Hypoxylon pruinatum* und *Melanconium betulinum* (Fries 1938). Dagegen brauchen *Melanospora destruens*, *Podospora curvula* und *Sordaria fimicola* nach Hawker (1938, 1939) nur einen Zusatz von Biotin, um in einer synthetischen Nährlösung wachsen zu können. Kürzlich hat Fries (1943 a) festgestellt, dass Biotin nebst Aneurin ein notwendiger Wuchsstoff für *Ophiostoma pini* ist, und dass das Wachstum mehrerer *Ophiostoma*-Arten beschleunigt wird, wenn man dem Medium Biotin zusetzt. *Mitrula paludosa* fordert nach Fries (l. c.) Biotin für die Sporenkeimung und unter gewissen Verhältnissen auch für das Wachstum.

Über den Einfluss des Biotins auf verschiedene mykorrhizabildende Basidiomyzeten haben Melin & Lindeberg (1939) sowie Melin & Nyman (1940) gewisse Untersuchungen vorgenommen. Alle untersuchten Pilze liessen sich in einer synthetischen Nährlösung mit Aneurin ohne Zusatz von Biotin züchten, wenn auch dieser Stoff in gewissen Fällen einen stimulierenden Einfluss auf das Wachstum ausübte.

Treschow (1943) fand, dass *Psalliota hortensis* eine synthetische Nährlösung assimilieren konnte, wenn diese mit Biotin versetzt war, dass aber der Pilz zu maximaler Entwicklung ausserdem einen Zusatz von Pantothensäure, Nikotinsäureamid und Aneurin forderte.

Unter den Bakterien wird *Staphylococcus aureus* sehr stark bei Züchtung in synthetischer Nährlösung stimuliert, wenn diese ausser Aneurin und Nikotinsäureamid auch Biotin enthält (v. Wagtendonk 1937, Kögl & v. Wagtendonk 1938). Nach Untersuchungen von Nilsson, Bjälfve & Burström (1939) fordern gewisse Stämme von *Bact. radicicola* Biotin für ihr Wachstum.

Organismen, welche Inosit brauchen oder von ihm stimuliert werden, sind meines Wissens bisher nur unter den Askomyzeten bekannt. Eastcott (1928) wies nach, dass diese Substanz ein notwendiger Wuchsstoff für Hefe ist. Buston & Pramanik (1931) fanden, wie oben erwähnt, dass Inosit der eine der Wuchsstoffe ist, welche *Nematospora gossypii* fordert. Kögl & Fries (1937) sowie Fries (1938) stellten fest, dass gewisse Pilze, die Aneurin und Biotin fordern, um eine synthetische Nährlösung assimilieren zu

können (*Lophodermium pinastri* bzw. *Valsa pini* und *Melanconium betulinum*), eine mehr oder minder starke Wachstumssteigerung zeigen, wenn auch Inosit der Lösung zugesetzt wird.

Vergleichende Untersuchungen über den Bedarf verschiedener Mikroorganismen an Wuchsstoffen haben ergeben, dass solche Organismen, denen kein bestimmter Wuchsstoff zugeführt zu werden braucht, denselben in der Regel selbst bilden. Solche Erfahrungen wurden zuerst bei gewissen Tuberkulosebakterien von Twort & Ingram (1913) und bei gewissen hämolytischen Bakterien von Fildes (1924) und Valentine & Rivers (1927) u. a. gemacht. Hier sind ferner zu nennen Lwoffs (1934) Untersuchungen über parasitische Flagellaten, Schopfers (1935 a) Forschungen über Mucorazeen sowie Kögls & Fries' (1937) Entdeckung, dass Pilze, die einen Zusatz von Aneurin bzw. Biotin zu ihrer Entwicklung brauchen, ihre Wuchsstoffbildung gegenseitig ergänzen und deshalb ohne Zusatz von Aneurin oder Biotin zusammen gezüchtet werden können.

Diese und gewisse andere Resultate liegen der Auffassung des Wuchsstoffproblems zugrunde, die jetzt allgemein anerkannt ist und sich folgendermassen ausdrücken lässt: Mehrere Wuchsstoffe sind für alle Organismen notwendig, aber die Fähigkeit, einen oder mehrere dieser Stoffe zu synthetisieren, ist einem Teil der Organismen im Verlauf der Entwicklung ganz oder teilweise verloren gegangen (Lwoff 1934, S. 517, Schopfer 1935 a, S. 207, Knight 1936, S. 147, Fries 1938, S. 168).

Schopfer (1938 a, 1939) hat auf diesem Gebiet folgende Terminologie vorgeschlagen: Organismen, die selbst alle die Wuchsstoffe synthetisieren können, die für das Wachstum notwendig sind, nennt er auxoautotroph, Organismen, denen die Fähigkeit fehlt, einen oder mehrere notwendige Wuchsstoffe zu synthetisieren, auxoheterotroph. Kann ein Organismus nicht Aneurin bilden, so wird er als aneurinheterotroph bezeichnet, kann er nicht Biotin bilden, als biotinheterotroph usw.

1. Der Einfluss von Aneurin, Biotin und Inosit in Überschuss.[1]

Weil die auxoheterotrophen Hymenomyzeten nach Angaben in der Literatur in den meisten Fällen einen Zusatz von Aneurin fordern, um eine synthetische Nährlösung assimilieren zu können, beschloss ich, in einem ersten orientierenden Versuch elf verschiedene *Marasmius*-Arten in einer synthetischen Nährlösung teils ohne Zusatz von Wuchsstoff, teils mit Zusatz von Aneurin bzw. Hefeextrakt zu züchten. (*M. chordalis*, *M. epiphyllus* und *M. putillus* waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht isoliert.)

[1] Eine vorläufige Mitteilung über diese Untersuchungen ist bereits veröffentlicht worden (Lindeberg 1939 a).

Versuch 2. Der Einfluss von Aneurin und Hefeextrakt auf das Wachstum verschiedener Marasmius-Arten (Tab. 15).

Nährlösung:

Glykose	10 g		$MgSO_4 . 7H_2O$	0,5 g	
NH_4NO_3	0,5 g		$FeCl_3 . 6H_2O$ (1 %ige Lösung)	10	Tropfen
KH_2PO_4	0,25 g		H_2O (dest.)	1000	ccm
K_2HPO_4	0,25 g				

pH (nach Autoklavieren): 5,7

Reihen: a) Kontrolle.
b) 1 γ Aneurin je Kolben.
c) 1 mg Hefeextrakt je Kolben.

Der Hefeextrakt wurde in folgender Weise zubereitet: 1 Teil Bäckereihefe + 2 Teile H_2O wurden im Autoklaven erhitzt. Die Lösung wurde durch ein Seitz-Filter filtriert, worauf ihr Gehalt an Trockensubstanz bestimmt wurde. Danach wurde sie so verdünnt, dass sie 1 mg Trockensubstanz je ccm enthielt. Von dieser Hefeextraktlösung wurde in Reihe c 1 ccm je Kolben zugesetzt.

M. androsaceus und *M. perforans* wurden von Kulturen auf Malzagar verimpft, die übrigen Pilze von „synthetischem" Agar (Zusammensetzung: obige Nährlösung + 15 g Agar je Liter). 4 Parallelkolben.

In der Kontrollreihe war für sämtliche Arten kein oder nur ganz unbedeutendes Wachstum zu konstatieren. Enthielt die Nährlösung Aneurin, so konnte sie indes von allen untersuchten Arten mit Ausnahme von *M. androsaceus* und *M. oreades* assimiliert werden. Nur wenn die Nährlösung mit Hefeextrakt versetzt war, konnte sie von den beiden letztgenannten Arten assimiliert werden, wenngleich das Wachstum auch unter solchen Verhältnissen ziemlich schwach war. Die übrigen Arten wuchsen in der Regel in der Hefeextraktreihe rascher als in der Aneurinreihe.

Das Versuchsresultat muss so gedeutet werden, dass *M. alliaceus*, *M. foetidus*, *M. fulvobulbillosus*, *M. graminum*, *M. perforans*, *M. peronatus*, *M. ramealis*, *M. rotula* und *M. scorodonius* unter den herrschenden Versuchsbedingungen nicht oder nur ganz unbedeutend selbst Aneurin bilden konnten und dass sie deshalb darauf angewiesen waren, dass der Wuchsstoff von aussen zugeführt wurde. Eine Aneurinmenge von 1 γ in 20 oder 25 ccm Nährlösung von der ungefähren Zusammensetzung, wie sie hier verwendet wurde, kann nach Kögl & Fries (1937) sowie Fries (1938) als ein Überschuss des Wuchsstoffes im Verhältnis zu den übrigen Bestandteilen der Nährlösung angesehen werden. Dass die Pilze grössere Wachstumsgeschwindigkeit in der Hefeextraktreihe aufwiesen, zeigt deshalb, dass Hefeextrakt ausser Aneurin organische oder anorganische Stoffe enthält, welche die vegetative Entwicklung der Pilze günstig beeinflussen. Für *M. androsaceus* und *M. oreades* scheinen solche Substanzen, möglicherweise neben Aneurin, für das Wachstum notwendig zu sein.

Tabelle 15.

Der Einfluss von Aneurin und Hefeextrakt auf das Wachstum verschiedener *Marasmius*-Arten (Versuch 2).

Versuchsobjekt	Versuchszeit in Tagen	Myzel-Trockengewicht in mg		
		Kein Zusatz	1 γ Aneurin je Kolben	1 mg Hefeextrakt je Kolben
M. alliaceus	15	0,2 ± 0,0	4,0 ± 0,4	7,1 ± 0,5
M. androsaceus A	15	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,0	1,9 ± 0,3
M. foetidus A	15	0,1 ± 0,0	5,5 ± 0,4	9,5 ± 0,4
M. fulvobulbillosus A	32	0,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	8,3 ± 0,6
M. graminum	15	0,3 ± 0,0	4,4 ± 0,9	7,5 ± 1,1
M. oreades A	15	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,3 ± 0,3
M. perforans A	15	0,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	6,1 ± 0,5
M. peronatus A	32	0,1 ± 0,0	4,4 ± 1,0	13,5 ± 0,5
M. ramealis A	15	0,2 ± 0,0	4,5 ± 0,4	7,1 ± 0,3
M. rotula A	32	0,2 ± 0,0	5,2 ± 0,5	5,3 ± 0,6
M. scorodonius A	15	0,1 ± 0,0	8,9 ± 0,8	15,8 ± 0,8

Es liegt nahe anzunehmen, dass die günstige Wirkung des Hefeextrakts auf seinem Gehalt an anderen Biosfaktoren als Aneurin beruhte. Um zu ermitteln, inwieweit die Pilze einen Zusatz der in reiner Form zugänglichen Biosfaktoren Biotin und Inosit fordern oder von ihm stimuliert werden, wurde deshalb eine Reihe Experimente ausgeführt — hier unter der Bezeichnung 'Versuch 3' zusammengefasst —, bei denen Aneurin, Biotin und Inosit je für sich und in allen möglichen Kombinationen der Nährlösung zugesetzt wurden (vgl. Kögl & Fries 1937).

Versuch 3. Der Einfluss von Aneurin, Biotin und Inosit auf das Wachstum verschiedener Marasmius-Arten (Tab. 16).

Grundlösung:	Glykose	10	g
	KH_2PO_4	0,5	g
	$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5	g
	$FeCl_3 . 6 H_2O$ (1 %ige Lösung)	10	Tropfen
	H_2O (dest.)	1000	ccm

Als N-Quelle wurde für *M. androsaceus*, *M. foetidus* und *M. peronatus* 1 g NH_4Cl und für die übrigen Arten 1 g NH_4-Tartrat je Liter verwendet. In den Reihen mit *M. androsaceus*, *M. foetidus*, *M. fulvobulbillosus* und *M. peronatus* wurde 1 mg Zn (als $ZnSO_4 . 7 H_2O$) je Liter Nährlösung zugesetzt.

Tabelle

Der Einfluss von Aneurin, Biotin und Inosit auf das

	Versuchsobjekt	Versuchs-zeit in Tagen	Myzel-Trocken-		
			Kein Zusatz	1 γ Aneurin je Kolben	0,05 γ Biotin je Kolben
1	*M. alliaceus*	15	0,1 ± 0,0	4,4 ± 0,3	0,1 ± 0,0
2	*M. androsaceus* B	20	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1
3	*M. foetidus* A.	20	0,5 ± 0,1	9,2 ± 0,6	1,4 ± 0,1
4	*M. fulvobulbillosus* B	20	1,6 ± 0,2	6,7 ± 0,6	1,9 ± 0,1
5	*M. graminum*	20	0,3 ± 0,0	11,9 ± 0,3	0,2 ± 0,0
6	*M. perforans* B	33	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,2
7	*M. peronatus* A	20	1,0 ± 0,1	4,2 ± 0,3	1,7 ± 0,1
8	*M. ramealis* A	20	0,9 ± 0,1	4,7 ± 0,4	0,9 ± 0,1
9	*M. rotula* A	40	0,2 ± 0,0	14,8 ± 2,5	0,2 ± 0,0
10	*M. scorodonius* A	20	0,1 ± 0,0.	6,8 ± 0,4	0,1 ± 0,0

pH der Nährlösung nach Autoklavieren:

NH_4Cl als N-Quelle 4,4

NH_4-Tartrat als N-Quelle . . . . . 5,5.

M. alliaceus, M. graminum, M. rotula und *M. scorodonius* wurden von Kulturen auf „synthetischem" Agar verimpft (siehe Versuch 2), die übrigen Pilze von Malzagar. Von jeder Reihe wurden mit *M. alliaceus, M. graminum, M. perforans, M. ramealis* und *M. rotula* 8 Kolben, mit *M. scorodonius* 6 Kolben und mit *M. androsaceus, M. foetidus, M. fulvobulbillosus* und *M. peronatus* 4 Kolben geimpft.

In der Kontrollreihe war die Entwicklung der Pilze wie beim vorigen Versuch äusserst unbedeutend.

M. alliaceus, M. foetidus, M. fulvobulbillosus, M. graminum, M. peronatus, M. ramealis., M. rotula und *M. scorodonius* konnten wie in Versuch 2 die Nährlösung assimilieren, wenn diese mit Aneurin versetzt war. Biotin hatte sowohl allein als in Verbindung mit Aneurin einen ganz schwachen positiven Effekt auf *M. foetidus*, dagegen keine sicher feststellbare Wirkung auf die übrigen genannten Arten.

M. perforans reagierte nur schwach auf einen Zusatz von Aneurin allein. In Anwesenheit von Aneurin + Biotin zeigte diese Art dagegen gutes Wachstum. Auch allein hatte das Biotin einen gewissen, wenngleich unbedeutenden Einfluss auf diesen Pilz. Zu bemerken ist, dass der *M. perforans*-Stamm, der bei diesem Versuch verwendet wurde, ein anderer war als der in Versuch 2 untersuchte.

6.

Wachstum verschiedener *Marasmius*-Arten (Versuch 3).

Gewicht in mg

	1 mg Inosit je Kolben	1 γ Aneurin + 0,05 γ Biotin je Kolben	1 γ Aneurin + 1 mg Inosit je Kolben	0,05 γ Biotin + 1 mg Inosit je Kolben	1 γ Aneurin + 0,05 γ Biotin + 1 mg Inosit je Kolben
1	0,1 ± 0,0	4,2 ± 0,1	4,9 ± 0,3	0,2 ± 0,0	5,4 ± 0,2
2	0,3 ± 0,0	6,0 ± 0,3	0,5 ± 0,1	2,3 ± 0,2	6,7 ± 0,4
3	0,6 ± 0,1	13,2 ± 0,7	10,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	12,6 ± 1,0
4	1,7 ± 0,2	6,3 ± 0,2	6,1 ± 0,5	1,5 ± 0,2	6,6 ± 1,1
5	0,3 ± 0,0	13,9 ± 0,2	13,4 ± 0,8	0,2 ± 0,0	12,6 ± 0,6
6	0,6 ± 0,2	12,6 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,1	11,7 ± 0,6
7	1,3 ± 0,2	4,1 ± 0,4	4,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	4,8 ± 0,2
8	1,1 ± 0,1	7,6 ± 0,4	6,5 ± 0,4	0,7 ± 0,1	5,9 ± 0,5
9	0,2 ± 0,0	13,0 ± 1,6	15,9 ± 1,6	0,2 ± 0,0	14,4 ± 1,7
10	0,1 ± 0,0	5,3 ± 0,6	6,6 ± 0,2	0,1 ± 0,0	7,2 ± 0,6

M. androsaceus endlich war völlig ausserstande, die Nährlösung zu assimilieren, wenn diese bloss mit Aneurin versetzt war. Nur in Gegenwart sowohl von Biotin als von Aneurin konnte diese Art die Nährlösung ganz ausnutzen. Auch auf diesen Pilz hatte Biotin allein einen gewissen Effekt.

Inosit hatte auf keinen der untersuchten Pilze eine merkliche Wirkung.

Mit *M. oreades*, der in Versuch 3 nicht untersucht wurde, wurde ein weniger umfassender Versuch ausgeführt, um zu ermitteln, ob Aneurin, Biotin und Inosit zusammen dem Pilz von aussen zugeführt werden müssen, damit Wachstum möglich ist. Das Wachstum in einer Lösung mit den drei genannten Wuchsstoffen wurde mit dem in einer Lösung verglichen, die mit Hefeextrakt (Marmite) versetzt worden war.

Versuch 4. Der Einfluss von Aneurin, Biotin und Inosit sowie von Hefeextrakt auf das Wachstum von Marasmius oreades A.

Grundlösung wie in Versuch 3. Als N-Quelle diente NH_4-Tartrat in der Konzentration 1 g je Liter. Zn wurde in der Konzentration 1 mg je Liter zugesetzt.

Reihen: a) Kontrolle.
b) 1 γ Aneurin + 0,05 γ Biotin + 1 mg Inosit je Kolben.
c) 1 mg Hefeextrakt (Marmite) je Kolben.
4 Parallelkolben.

Nach 20 Tagen wurden in den verschiedenen Reihen folgende Myzelmengen erhalten:

a) 0,4 ± 0,1 mg.
b) 0,5 ± 0,1 mg.
c) 4,1 ± 0,2 mg.

Der Versuch zeigte wie Versuch 2, dass dem Pilz, damit er eine synthetische Nährlösung assimilieren konnte, ein Stoff von organischer oder anorganischer Natur zugeführt werden musste, der in Hefeextrakt enthalten ist. Dieser Stoff ist nicht identisch mit einem der drei untersuchten Wuchsstoffe. Die Frage, ob der Pilz auch einen Zusatz dieser letztgenannten Stoffe fordert, kann auf Grund dieser Versuchsresultate nicht entschieden werden.[1]

Das Verhalten von *M. androsaceus* und *M. perforans* zu Biotin ist besonders interessant. Aus den Versuchen 2 und 3 geht hervor, dass sich die beiden Pilze in gewissem Grade verschieden verhielten. *M. androsaceus* zeigte in keinem der beiden Versuche Wachstum in einer Nährlösung, die bloss mit Aneurin versetzt war. Von den beiden Stämmen von *M. perforans* reagierte dagegen der eine (Stamm B in Versuch 3) ganz schwach, der andere (Stamm A in Versuch 2) etwas stärker auf Aneurin allein. Es schien also, dass der Biotinbedarf von *M. androsaceus* und *M. perforans* verschieden stark sei, sowie, dass eine gewisse Abstufung des Biotinbedarfes bei verschiedenen Stämmen der letztgenannten Art vorliege.

Wegen dieser Resultate beschloss ich, den Einfluss von Biotin auf eine Anzahl verschiedener Stämme sowohl von *M. androsaceus* als von *M. perforans* zu untersuchen. Um Biotin zu sparen, beschränkte ich die Versuche auf drei Reihen, nämlich eine Kontrollreihe, eine Reihe mit Aneurin und eine mit Aneurin + Biotin. Diese Anordnung der Versuche schloss die Möglichkeit aus, zu entscheiden, ob eines der Versuchsobjekte eine Nährlösung assimilieren konnte, die bloss mit Biotin versetzt war. Es dürfte jedoch als wenig wahrscheinlich anzusehen sein, dass ein Stamm der hier in Betracht kommenden Arten sich in dieser Weise verhält (vgl. S. 78).

In Versuch 5 wurde die Wirkung von Biotin in Verbindung mit Aneurin

[1] Fortgesetzte Untersuchungen zeigten, dass *Marasmius oreades* wenigstens unter gewissen Bedingungen eine synthetische Nährlösung assimilieren kann, wenn diese mit Aneurin versetzt ist. Indes scheinen grosse Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen der Art vorzuliegen, und die physiologischen Eigenschaften können sich stark ändern, wenn der Pilz längere Zeit in Kultur gehalten wird. Infolgedessen ergaben die Versuche mit *M. oreades* nicht völlig miteinander übereinstimmende Resultate. Eingehendere Untersuchungen über diese Art sind erforderlich. In der weiteren Darstellung ist dieselbe fortgelassen. Jedoch sei hier erwähnt, dass das Wachstum von *M. oreades* begünstigt wird, wenn die N-Quelle in Asparagin besteht, das pH einen Wert von ca. 5 hat und die Lösung mit Ca versetzt ist.

sowie von Aneurin allein auf das Wachstum von drei bisher nicht untersuchten Stämmen von *M. androsaceus* untersucht.

Versuch 5. Der Einfluss von Aneurin und Biotin auf das Wachstum verschiedener Stämme von Marasmius androsaceus (Tab. 17).

Nährlösung A. In Versuch 5 betrug das pH der Lösung 4,5 infolge Zusatz von 7,5 ccm 1-n H_2SO_4 je Liter.

Reihen: a) Kontrolle.
b) 1 γ Aneurin je Kolben.
c) 1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin je Kolben.
4 Parallelkolben.

Tabelle 17.

Der Einfluss von Aneurin und Biotin auf das Wachstum verschiedener Stämme von *Marasmius androsaceus* (Versuch 5).

Versuchszeit: 20 Tage.

Versuchsobjekt	Myzel-Trockengewicht in mg		
	Kein Zusatz	1 γ Aneurin je Kolben	1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin je Kolben
Stamm C . .	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	16,0 ± 2,1
» D . .	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,9 ± 0,1
» E . .	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	7,7 ± 0,9

Aus den Versuchsresultaten geht hervor, dass auch diese Stämme die synthetische Nährlösung nicht assimilieren konnten, wenn dieselbe kein Biotin enthielt. Die Stämme C und E zeigten gutes Wachstum bei Anwesenheit von Aneurin und Biotin, Stamm D dagegen wuchs sehr langsam. Es ist wahrscheinlich, dass der letztgenannte Stamm ausser den hier zugesetzten Wuchsstoffen noch einen weiteren Stoff forderte, über dessen Natur sich hier nichts sagen lässt.

In derselben Weise wurde in Versuch 6 der Einfluss von Biotin und Aneurin auf das Wachstum verschiedener Stämme von *M. perforans* untersucht.

Versuch 6. Der Einfluss von Aneurin und Biotin auf das Wachstum verschiedener Stämme von Marasmius perforans (Tab. 18).

Nährlösung:	Glykose	10	g
	NH_4-Tartrat	1	g
	KH_2PO_4	0,5	g
	$MgSO_4 . 7\,H_2O$	0,5	g
	$FeCl_3 . 6\,H_2O$ (1 %ige Lösung)	10	Tropfen

$ZnSO_4$-Lösung (Zn-Konz. 1/500)	0,5 ccm
H_2O (dest.)	1000 ccm
pH nach Autoklavieren	5,5

Reihen: a) Kontrolle.
b) 1 γ Aneurin je Kolben
c) 1 γ Aneurin + 0,04 γ Biotin je Kolben.
6 Parallelkolben.

Tabelle 18.

Der Einfluss von Aneurin und Biotin auf das Wachstum verschiedener Stämme von *Marasmius perforans* (Versuch 6).

Versuchszeit: 30 Tage.

Versuchsobjekt			Myzel-Trockengewicht in mg		
			Kein Zusatz	1 γ Aneurin je Kolben	1 γ Aneurin + 0,04 γ Biotin je Kolben
M. perforans		A	0,2 ± 0,0	2,0 ± 0,5	8,3 ± 1,1
»	»	B	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	15,4 ± 0,7
»	»	C	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,2 ± 0,5
»	»	D	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,2	2,5 ± 0,7
»	»	E	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,1 ± 0,4
»	»	F	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,3
»	»	G	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0

Das früher konstatierte Unvermögen des Pilzes, eine Nährlösung zu assimilieren, die bloss Zucker und gewöhnliche Nährsalze enthält, wurde durch diesen Versuch bestätigt. Auf einen Zusatz von Aneurin allein reagierten die Stämme A, B und D schwach positiv. Enthielt die Lösung ausserdem Biotin, so zeigten die Stämme A und B ziemlich gutes Wachstum. Stamm D wuchs auch in diesem Fall langsam, aber doch deutlich besser als in Anwesenheit von Aneurin allein. Die Stämme C, E und F reagierten schwach positiv auf Aneurin + Biotin. Stamm G dagegen konnte nicht einmal in Gegenwart dieser beiden Wuchsstoffe die Nährlösung assimilieren.

Es ist wahrscheinlich, dass ausser Aneurin und Biotin ein oder mehrere andere Wuchsstoffe dem Pilz von aussen zugeführt werden müssen, damit optimale Wachstumsbedingungen geschaffen werden. Dass die Zusammensetzung der Nährlösung hinsichtlich der Energiequelle und der gewöhnlichen Nährsalze kein Hindernis für die Entwicklung des Pilzes bot, geht ja daraus hervor, dass z. B. Stamm B die Lösung bei Anwesenheit von Aneurin und Biotin sehr gut assimilieren konnte. Der Bedarf an diesem einstweilen unbekannten Wuchsstoff (bzw. Wuchsstoffen) muss bei verschie-

denen Stämmen des Pilzes als verschieden gross angenommen werden. Stamm G scheint den grössten, Stamm B dagegen den kleinsten Bedarf zu haben.

Aus den Versuchen 5 und 6 ergibt sich, dass der Bedarf an gewissen Wuchsstoffen bei verschiedenen Stämmen ein und derselben Art verschieden gross sein kann. Dies haben in letzter Zeit mehrere Forscher für Pilze mit ganz verschiedener systematischer Stellung konstatiert. So geht aus den Untersuchungen von Ledeboer und Fries über *Ophiostoma ulmi* hervor, dass gewisse Stämme dieses Pilzes auf synthetischem Substrat ohne Zusatz organischer Wuchsstoffe wachsen können (Ledeboer 1934), während andere für ihr Wachstum einen Zusatz von Vitamin B_6 fordern (Fries 1942). Melin & Nyman (1941) fanden, dass zwei verschiedene Stämme von *Boletus granulatus* sich hinsichtlich ihres Aneurinbedarfs verschieden verhielten. Der eine Stamm entwickelte sich in synthetischer Nährlösung ohne dieses Vitamin, während der andere ohne Aneurin kaum ein Wachstum zeigte. Robbins & Ma (1941) untersuchten den Biotinbedarf von drei verschiedenen Stämmen von *Fusarium avenaceum* und stellten fest, dass bloss einer von ihnen einen Zusatz dieses Wuchsstoffes forderte. Hier sei auch an die Entdeckung von Nilsson u. Mitarb. (1939) erinnert, dass gewisse Stämme von *Bact. radicicola* Biotin fordern, während sich andere ohne diesen Wuchsstoff entwickeln. Aus Resultaten, die bei Untersuchungen mit einem bestimmten Stamm eines Pilzes gewonnen wurden, lassen sich deshalb allgemeine Schlüsse hinsichtlich der Eigenschaften der betreffenden Art nur mit einem gewissen Vorbehalt ziehen.

Nachdem man gefunden hatte, dass mehrere Pflanzenorganismen nur bei Anwesenheit von Aneurin eine synthetische Nährlösung assimilieren können, machten einige Forscher die Beobachtung, dass aneurinreiche Präparate, ohne ihre Wirkung auf diese Organismen einzubüssen, eine sehr starke Erhitzung vertragen. Hieraus zog man den Schluss, dass gewisse Spaltungsprodukte des Aneurins dieses ersetzen können. Knight (1937) gelang es auch nachzuweisen, dass die beiden Aneurinkomponenten 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin und 4-Methyl-5-β-oxyäthyl-thiazol in äquivalenten Mengen zusammen Aneurin als Wuchsstoff für *Staphylococcus aureus* ersetzen können. Dasselbe konstatierten Schopfer & Jung (1937), Sinclair (1937) sowie Robbins & Kavanagh (1937) bei *Phycomyces Blakesleeanus*. Später hat sich herausgestellt, dass gewisse Organismen, die zu ihrer Entwicklung einen Zusatz von Aneurin zu fordern scheinen, in Wirklichkeit nur die eine oder die andere der beiden ebenerwähnten Aneurinkomponenten nötig haben. So braucht *Rhodotorula rubra* bloss Pyrimidin (Schopfer 1937 b, 1938 b), *Mucor Ramannianus* dagegen nur Thiazol (Müller & Schopfer 1937, Müller 1941). Diese beiden

Organismen können sich zusammen in einer wuchsstoffreien Nährlösung entwickeln, was zeigt, dass jeder von ihnen selbst die Aneurinkomponente bildet, die bei Reinkulturversuchen nicht zugesetzt zu werden braucht (Müller & Schopfer l. c.).

Lohmann & Schuster (1937) fanden, dass das Aneurin in Cocarboxylase enthalten und also eine für den Kohlenhydratumsatz notwendige Enzymkomponente ist. Deshalb und wegen Schopfers und Müllers oben erwähnter Entdeckungen dürfte man zu der Annahme berechtigt sein, dass alle Organismen, welche wie *Rhodotorula rubra* und *Mucor Ramannianus* scheinbar bloss die eine der Aneurinkomponenten fordern, die andere dieser Komponenten selbst bilden (vgl. S. 49).

Um festzustellen, inwieweit die beiden Aneurinkomponenten (im folgenden der Kürze halber bloss Pyrimidin und Thiazol genannt) zusammen oder jede für sich möglicherweise Aneurin für die fraglichen *Marasmius*-Arten ersetzen können, wurde Versuch 7 ausgeführt. Die Pilze wurden hier in synthetischer Nährlösung gezüchtet, die teils mit Aneurin, teils mit den beiden Aneurinkomponenten je für sich und in Verbindung miteinander versetzt wurde. Das Aneurin und seine Komponenten wurden in äquivalenten Mengen zugesetzt.

Da die Molekulargewichte der benutzten Formen von Aneurin, Pyrimidin und Thiazol 337,3, 211,1 und 143,2 betragen, entsprechen 1 γ Aneurin 0,626 γ Pyrimidin und 0,425 γ Thiazol.

Nachdem auch die drei Arten *M. chordalis*, *M. epiphyllus* und *M. putillus* isoliert worden waren, wurden orientierende Versuche ausgeführt, welche ergaben, dass sich diese Arten in einer synthetischen Nährlösung züchten liessen, wenn dieselbe mit Aneurin versetzt war. Auch diese Pilze wurden deshalb bei Versuch 7 herangezogen.

Versuch 7. Der Einfluss von Pyrimidin, Thiazol und Aneurin auf das Wachstum verschiedener Marasmius-Arten (Tab. 19).

Nährlösung A. 5 Reihen, siehe Tab. 19.

Pyrimidin und Thiazol wurden vor dem Autoklavieren zugesetzt, Aneurin (in neubereiteter Lösung, hergestellt unter aseptischen Bedingungen) nach demselben. Den Kolben, die mit *M. androsaceus* geimpft werden sollten, wurden ausserdem vor dem Autoklavieren 10 mγ Biotin zugesetzt. 4 Parallelkolben.

Während Thiazol allein auf keine der *Marasmius*-Arten eine deutliche Wirkung ausübte, ermöglichte Pyrimidin Wachstum für *M. chordalis*, *M. epiphyllus*, *M. fulvobulbillosus* und *M. graminum*. Für *M. fulvobulbillosus* konnte Pyrimidin vollständig Aneurin ersetzen. Dieser Pilz stimmt also in dieser Hinsicht mit *Rhodotorula rubra* überein (Schopfer 1937 b, 1938 b). Die drei anderen Arten wuchsen dagegen mit Pyrimidin allein

Tabelle 19.

Der Einfluss von Pyrimidin, Thiazol und Aneurin auf das Wachstum der Pilze (Versuch 7).

Versuchsobjekt	Versuchszeit in Tagen	Myzel-Trockengewicht in mg				
		Kein Zusatz	0,626 γ Pyrimidin je Kolben	0,425 γ Thiazol je Kolben	0,626 γ Pyrimidin + 0,425 γ Thiazol je Kolben	1 γ Aneurin je Kolben
M. alliaceus . . .	39	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	1,4 ± 0,2	14,1 ± 1,5	10,9 ± 0,9
M. androsaceus .	22	1,5 ± 0,1	3,6 ± 0,6	2,5 ± 0,2	22,6 ± 0,7	21,9 ± 0,5
M. chordalis . . .	39	0,3 ± 0,0	1,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0	2,7 ± 0,2	2,4 ± 0,2
M. epiphyllus . .	39	0,2 ± 0,0	4,3 ± 1,1	0,5 ± 0,1	12,4 ± 1,6	12,3 ± 0,3
M. foetidus A . .	36	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,3	29,0 ± 0,6	27,6 ± 0,7
M. fulbobulb. B .	45	2,5 ± 0,3	5,4 ± 0,4	2,6 ± 0,3	6,0 ± 0,8	5,5 ± 0,3
M. graminum . .	20	1,1 ± 0,2	54,9 ± 3,3	0,9 ± 0,1	89,9 ± 1,7	75,5 ± 3,4
M. perforans A .	22	1,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,8 ± 0,3	19,7 ± 0,9	7,6 ± 0,2
M. peronatus A .	36	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2	10,9 ± 0,5	10,0 ± 1,5
M. putillus . . .	39	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	4,0 ± 0,2	4,1 ± 0,4
M. ramealis A . .	36	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	5,1 ± 0,4	5,4 ± 0,4
M. rotula B . . .	36	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,3	7,5 ± 1,2	8,1 ± 0,8
M. scorodonius A.	20	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2	7,8 ± 1,2	7,9 ± 0,6

langsamer als mit Pyrimidin + Thiazol oder mit Aneurin. Diese Pilze verhalten sich wie *Absidia ramosa* und *Parasitella simplex* (SCHOPFER 1937 c). Für Pilze des letztgenannten Typus muss man annehmen, dass sie eine gewisse begrenzte Fähigkeit zur Bildung von Thiazol besitzen, während sie kein Pyrimidin bilden können. Wird die letztgenannte Komponente im Überschuss zugeführt, so wachsen die Pilze mit einer Geschwindigkeit, die durch ihre Fähigkeit zur Synthetisierung von Thiazol bestimmt ist (SCHOPFER l. c.).

Pyrimidin und Thiazol konnten zusammen Aneurin für sämtliche Arten vollständig ersetzen. Für *M. perforans* war die Wachstumsgeschwindigkeit in der Pyrimidin-Thiazol-Reihe sogar bedeutend grösser als in der Aneurinreihe, und auch bei *M. graminum* ermöglichten die beiden Aneurinkomponenten zusammen ein etwas rascheres Wachstum als das Aneurin. Das Verhältnis der beiden letztgenannten Pilze zu Aneurin und seinen beiden Komponenten ist eigentümlich, aber nicht einzigartig. SCHOPFER & BLUMER (1940) fanden, dass *Polyporus abietinus*, *P. benzoinus* und *P. zonatus* sich in derselben Weise verhielten, und MELIN & NORKRANS (1942)

konstatierten dasselbe für *Boletus luteus* und *B. piperatus*. Eine Erklärung dieser Erscheinung hat man bisher nicht geben können. Man könnte daran denken, dass die Pilze, um das Aneurin aufnehmen zu können, dasselbe zuerst in seine Komponenten spalten müssen, und dass diese Spaltung sich mit einer gewissen Schwierigkeit vollzieht. Die Möglichkeit, dass Pyrimidin-Thiazol-Organismen das Aneurin spalten, wird auch von Hills (1938) und Schopfer (1938 a, 1939 S. 89) erörtert. Da es ja andererseits Pilze gibt, z. B. mehrere *Phytophthora*-Arten, die das ganze Aneurinmolekül brauchen, um eine synthetische Nährlösung assimilieren zu können (Robbins 1938), erscheint es gegenwärtig schwer, die verschiedenen Organismen von einem einheitlichen Gesichtspunkt aus zu betrachten.

Bei den Versuchen 3 und 6 ergab sich, dass *Marasmius perforans* nur mit gewisser Schwierigkeit eine synthetische Nährlösung assimilieren konnte, die bloss mit Aneurin versetzt war, dass aber die Wachstumsgeschwindigkeit bei den meisten Stämmen zunahm, wenn ausserdem Biotin zugesetzt wurde. Aus diesen Versuchen ging auch hervor, dass wenigstens gewisse Stämme dieser Art wahrscheinlich einen Zusatz noch eines oder mehrerer einstweilen unbekannter Wuchsstoffe fordern, um mit grösserer Geschwindigkeit wachsen zu können. (In der Folge wird der Einfachheit halber nur von einem solchen Stoff gesprochen.) Um den Wuchsstoffbedarf von *M. perforans* näher zu studieren, beschloss ich, in einem grösseren Versuch zunächst seine Wachstumskurve in einer Lösung zu untersuchen, die nur mit Aneurin versetzt war. Als Versuchsobjekte dienten drei Stämme von *M. perforans*, die bei Versuch 6 verschieden stark auf einen Zusatz von Biotin reagiert hatten.

Versuch 8. Das Wachstum verschiedener Stämme von Marasmius perforans in synthetischer Nährlösung mit Zusatz von Aneurin (Tab. 20, Fig. 3).

Nährlösung A. Als Versuchsobjekte wurden die Stämme A, B und E verwendet. Mit jedem Stamm wurden 6 Kolben geimpft, welche die Nährlösung ohne Aneurin enthielten, und 48 Kolben, welche dieselbe Lösung mit Zusatz von 1 γ Aneurin je Kolben enthielten.

Alle drei Stämme konnten die Nährlösung ohne Zusatz von Biotin assimilieren. Die Wachstumsgeschwindigkeit war jedoch anfangs sehr gering. Nach einer gewissen Zeit begann indes das Myzelwachstum mit grösserer Geschwindigkeit vor sich zu gehen. Dies geschah bei Stamm A nach ungefähr einem Monat und bei den Stämmen B und E nach etwa zwei Monaten. Hierauf wuchsen die Pilze mit guter Geschwindigkeit, bis ein Höchstwert des Trockengewichts erreicht war. Danach begann allmählich Autolyse der Myzelien. Worauf letzteres beruhte, wurde nicht untersucht. Indes ist es wahrscheinlich, dass der Zucker der Nährlösung verbraucht war.

Tabelle 20.

Das Wachstum verschiedener Stämme von *Marasmius perforans* in synthetischer Nährlösung mit Zusatz von Aneurin (Versuch 8).

Versuchszeit in Tagen	*M. perforans* A		*M. perforans* B		*M. perforans* E	
	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓
15	0,8	5,4	0,8	5,5	0,8	5,5
34	6,2	4,9	3,2	5,1	2,5	5,2
46	25,6	4,7	10,5	4,9	5,9	5,1
61	53,1	4,1	16,6	4,6	11,1	4,5
76	71,6	3,9	54,0	4,2	26,0	4,3
90	70,8	4,0	90,8	3,8	44,8	4,0
105	52,6	4,3	65,5	4,0	65,5	3,6
125	42,8	4,3	31,4	4,5	52,5	3,9

Kontrollen (nach 125 Tagen): Stamm A 1,0 mg
» B 0,7 »
» E 0,3 »

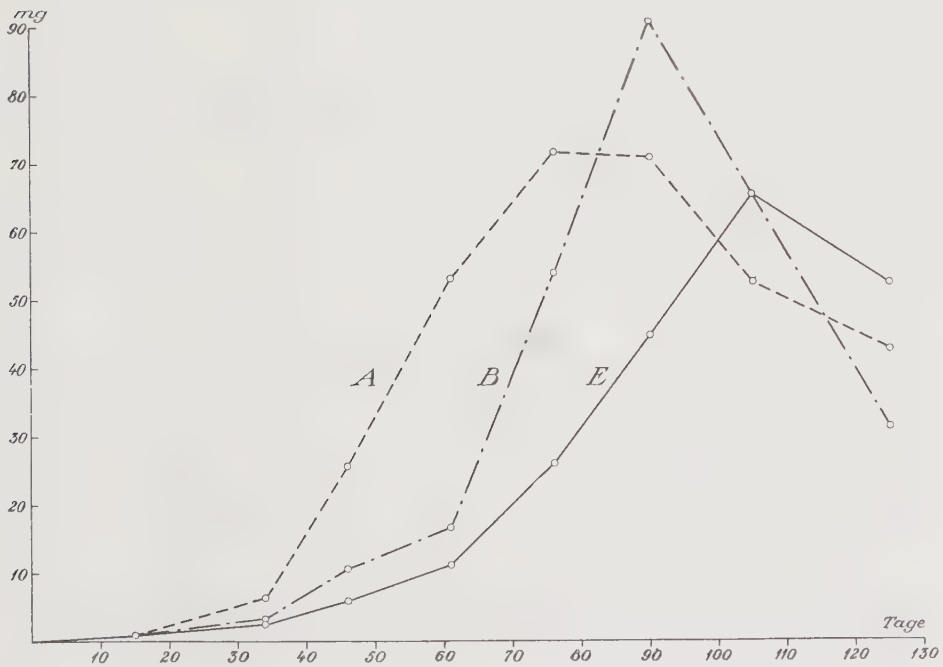

Fig. 3. Das Wachstum verschiedener Stämme (*A*, *B* und *E*) von *Marasmius perforans* in synthetischer Nährlösung mit Zusatz von 1 γ Aneurin je Kolben (Versuch 8).

Von besonderem Interesse ist, dass das Wachstum während einer gewissen, für die einzelnen Stämme verschieden langen Zeit verzögert war. Diese Zeit nenne ich im folgenden die *Induktionsperiode.*

Aus Tab. 20 geht hervor, dass *M. perforans* in Versuch 8 erst mit grösserer Geschwindigkeit zu wachsen begann, nachdem sich das pH in saurer Richtung verschoben hatte. Es wäre denkbar, dass eine beitragende Ursache der Induktionsperiode darin bestand, dass die Wasserstoffionenkonzentration der benutzten Nährlösung A suboptimal war und durch die Tätigkeit des Pilzes erhöht werden musste, bevor ein rascheres Wachstum in Gang kommen konnte. Ich beschloss deshalb, Versuch 8 mit der Veränderung zu wiederholen, dass das pH der Nährlösung von Anfang an durch Zusatz von Säure auf 4,2 gebracht wurde. Als Objekt für diesen Versuch wurde jedoch bloss einer der bei Versuch 8 verwendeten Stämme, nämlich Stamm A, gewählt.

Versuch 9. Das Wachstum von Marasmius perforans A in synthetischer Nährlösung von pH 4,2 mit Zusatz von Aneurin (Tab. 21).

Nährlösung A mit Zusatz von 125 ccm 0,1-n H_2SO_4 je Liter. Jedem Kolben wurde 1 γ Aneurin zugesetzt. pH nach dem Autoklavieren 4,2. 6 Parallelkolben.

Tabelle 21.

Das Wachstum von *Marasmius perforans* A in aneurinhaltiger synthetischer Nährlösung mit Anfangs pH 4,2 (Versuch 9).

Versuchszeit in Tagen	Trockengewicht mg	pH: 4,2 ↓
10	0,5	4,1
20	1,1	4,1
35	3,7	4,1
50	15,6	3,9

Ein pH von ungefähr 4 dürfte für *M. perforans* optimal sein (vgl. S. 111). Die Wachstumskurve für den Pilz bei diesem Versuch, wo das pH der Nährlösung von Anfang an einen solchen Wert hatte, war indes von demselben Typus wie die entsprechende Kurve in Versuch 8. Die Induktionsperiode für Stamm A war in Versuch 9 sogar etwas länger als in Versuch 8. Dies zeigt, dass die Induktionsperiode bei diesen Versuchen nicht nennenswert von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängig war.

Abgesehen von Aneurin bildet *M. perforans* teils Biotin, teils einen noch unbekannten Wuchsstoff in suboptimalen Mengen. Um die Induk-

tionsperiode zu erklären, kann man nun annehmen, dass während dieser Periode eine solche Veränderung des Stoffwechsels im Myzel eintritt, dass dieses einen der letztgenannten Wuchsstoffe oder beide in grösseren Mengen zu bilden beginnt. Es findet eine „Anpassung" an das synthetische Medium statt. Danach kann das Wachstum mit grösserer Geschwindigkeit vor sich gehen.

Um die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, beschloss ich, in einem neuen Versuch die Länge der Induktionsperiode für ein normales, auf Malzagar gezüchtetes Myzel eines der *M. perforans*-Stämme und für ein Myzel desselben Stammes zu vergleichen, das durch Versuch 8 an die Nährlösung „angepasst" worden war. Das letztgenannte Myzel musste erst auf ein agarhaltiges Medium übertragen werden, um von neuem in die Nährlösung geimpft werden zu können. Als Substrat für dieses Impfmyzel konnte bloss ein „synthetischer" Agar in Frage kommen, bestehend aus einer Nährlösung derselben Zusammensetzung wie in Versuch 8 sowie 1,5 % Agar, welch letzterer durch gründliches Waschen mit destilliertem Wasser von wasserlöslichen Wuchsstoffen befreit worden war.

Als Objekt für diese Untersuchung wählte ich Stamm E. Um schon durch die vorbereitende Züchtung des Impfmyzels auf dem synthetischen Agar eine Vorstellung zu gewinnen, ob sich die Physiologie des Pilzes verändert hatte, führte ich einen Versuch aus, in dem das von Versuch 8 übertragene Myzel und Myzel, welches ununterbrochen auf Malzagar gezüchtet worden war (Stammkultur), teils auf den „synthetischen" Agar, teils auf Malzagar geimpft wurden. Um gleichzeitig festzustellen, ob der „synthetische" Agar biotinfrei war, impfte ich auf beide Substrate teils *M. androsaceus*, der nach Versuch 3 einen Zusatz von Biotin fordert, teils *M. scorodonius*, der nach demselben Versuch einen solchen Zusatz nicht braucht.

Versuch 10. Züchtung von Stammkulturmyzel und einem von Versuch 8 übertragenen Myzel von Marasmius perforans E sowie von M. androsaceus B und M. scorodonius A auf gewaschenem Agar + synthetischer Nährlösung und auf Malzagar (Tab. 22).

Der „synthetische" Agar wurde folgendermassen bereitet: 15 g Agar wurden in einem Kolben mit ca. 1 Liter destilliertem Wasser versetzt. Nachdem der Agar gequollen und auf den Boden gesunken war, wurde der grössere Teil des Wassers vorsichtig abgegossen, worauf neues destilliertes Wasser zugefüllt wurde. Dieses Verfahren wurde eine Woche lang ein paarmal täglich wiederholt. Nach dem letzten Dekantieren wurden die erforderlichen Mengen Glykose, Nährsalze und Aneurin zugesetzt, und die Wassermenge auf 100 ccm gebracht. Durch Aufkochen wurde der Agar gelöst, worauf Sterilisierung und Giessen von Platten in gewöhnlicher Weise erfolgte.

Nachdem Versuch 8 112 Tage stattgefunden hatte, wurde das Myzel aus einem Kolben mit Stamm E in eine sterile Petrischale gebracht, mit einem sterilen Skalpell

zerstückelt und teils auf fünf Platten aus „synthetischem" Agar, teils auf fünf Platten aus gewöhnlichem Malzagar geimpft. Gleichzeitig wurden die Stammkultur desselben Stammes sowie *M. androsaceus* und *M. scorodonius* von Malzagar auf je gleich viele Platten dieser beiden Medien geimpft. Nach 14 Tagen wurde das Längenwachstum der Myzelien längs vier Radien auf jeder Platte gemessen und die Mittelwerte der erhaltenen Resultate berechnet.

Tabelle 22.

Das Wachstum von *Marasmius perforans*, *M. androsaceus* und *M. scorodonius* auf gewaschenem Agar + synthetischer Nährlösung und auf Malzagar (Versuch 10).

Versuchszeit: 14 Tage.

Versuchsobjekt	Radiales Wachstum in mm	
	Agar + synthetische Nährlösung	Malzagar
M. perforans E:		
Stammkultur	1	24
Myzel von Versuch 8 . .	7	18
M. androsaceus B . . .	1	37
M. scorodonius A . . .	33	>45

M. androsaceus konnte nicht auf dem „synthetischen" Agar auswachsen, was zeigt, dass dieses Substrat frei von Biotin war. *M. scorodonius*, der nicht biotinheterotroph ist, wuchs dagegen gut auf diesem Substrat. Die beiden Myzelien von *M. perforans* verhielten sich ungleich. Das Stammkulturmyzel wuchs nicht auf dem „synthetischen" Agar aus, das von Versuch 8 übertragene Myzel zeigte dagegen ein zwar langsames, aber doch deutliches Wachstum auf diesem Substrat.

Durch Versuch 11 wurden die Wachstumskurven für das Stammkulturmyzel und für das von Versuch 8 übertragene Myzel von *M. perforans* festgestellt. Die Myzelien wurden teils auf Nährlösung A mit Aneurin gezüchtet, teils auf dieser Nährlösung, versetzt mit 3 mγ Biotin je Kolben.

Versuch 11. Das Wachstum verschiedener Myzelien von Marasmius perforans E (Stammkulturmyzel und Myzel von Versuch 8) in aneurinhaltiger synthetischer Nährlösung mit und ohne Zusatz von Biotin (Tab. 23, Fig. 4).

Nährlösung A.

Reihen: a) 1 γ Aneurin je Kolben.
b) 1 γ Aneurin + 3 mγ Biotin je Kolben.

Für das Impfen wurden die Kulturen in Versuch 10 verwendet. Das Stammkulturmyzel wurde von Malzagar verimpft, das von Versuch 8 übertragene Myzel dagegen von dem „synthetischen" Agar. 6 Parallelkolben.

Tabelle 23.

Das Wachstum verschiedener Myzelien von *Marasmius perforans* E in aneurinhaltiger synthetischer Nährlösung mit und ohne Zusatz von Biotin (Versuch 11).

Versuchszeit in Tagen	Stammkulturmyzel				Myzel von Versuch 8			
	1 γ Aneurin		1 γ Aneurin + 3 mγ Biotin		1 γ Aneurin		1 γ Aneurin + 3 mγ Biotin	
	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓
15	0,3	5,5	0,6	5,5	0,9	5,5	2,4	5,2
30	1,0	5,4	2,1	5,3	7,6	5,0	15,3	4,5
50	5,7	4,7	10,2	4,3	42,1	4,0	65,8	3,8
65	11,3	4,0	23,7	3,9	76,9	3,4	72,5	3,4
80	41,9	3,8	61,4	3,6	51,5	4,2	47,7	4,2
95	73,9	4,0	68,6	3,8	42,9	4,2	43,4	4,2

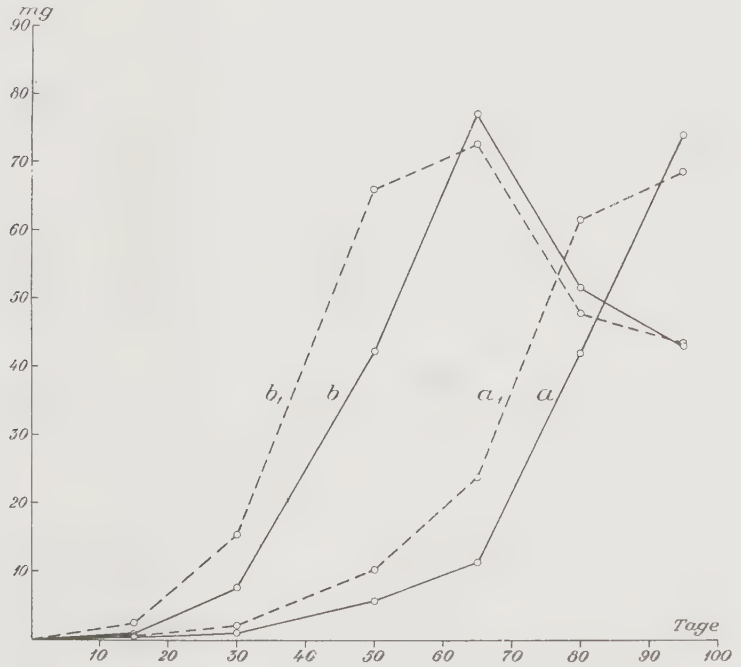

Fig. 4. Das Wachstum verschiedener Myzelien von *Marasmius perforans* E in aneurinhaltiger synthetischer Nährlösung mit (– – – – –) und ohne (———) Zusatz von Biotin. *a*, a_1: Stammkulturmyzel; *b*, b_1: Myzel von Versuch 8 (Versuch 11).

Die Wachstumskurve des Stammkulturmyzels in der biotinfreien Lösung zeigt gute Übereinstimmung mit der Wachstumskurve desselben Myzels in Versuch 8. Maximale Wachstumsgeschwindigkeit wurde bei beiden Versuchen erst im dritten Versuchsmonat erreicht. Das von Versuch 8 übertragene Myzel wies dagegen in Versuch 11 eine erheblich verkürzte Induktionszeit auf. Die Wachstumsgeschwindigkeit war für dieses Myzel im zweiten Versuchsmonat am grössten. Der Biotinzusatz bewirkte eine Verkürzung der Induktionszeit für beide Myzelien, und der Effekt war in beiden Fällen ungefähr gleich gross.

Die mit dem Impfmaterial zugeführte Menge Wuchsstoffe muss in der Reihe mit dem Stammkulturmyzel grösser gewesen sein als in der mit dem „übertragenen" Myzel. Da die Induktionszeit für das letztgenannte trotzdem verkürzt war, kann man den Schluss ziehen, dass die oben erörterte „Anpassung" an die synthetische Nährlösung wirklich eine Veränderung der Physiologie des Myzels bedeutete. Es lässt sich nicht mit voller Sicherheit entscheiden, worin diese physiologische Veränderung bestand. Da ein Zusatz von Biotin gleich starken Einfluss auf beide Myzelien hatte, halte ich es indes für unwahrscheinlich, dass sich die Fähigkeit, diesen Wuchsstoff zu synthetisieren, verändert hatte. Vielmehr dürfte die Synthese des unbekannten Wuchsstoffes bei dem „angepassten" Myzel an Intensität zugenommen haben.

Noch ein weiterer Versuch, der darauf abzielte, den Einfluss gewisser Faktoren auf die Länge der Induktionsperiode zu beleuchten, sei hier wiedergegeben. Bei diesem stellte ich die Wachstumskurve für den Pilz fest, wenn dieser in Nährlösung A gezüchtet wurde, die in einer Reihe mit Aneurin, in einer anderen mit Pyrimidin und Thiazol und in einer dritten mit Aneurin und Mangan versetzt worden war. Das letztgenannte Metall ist, wie wir später (vgl. S. 125) sehen werden, von ausserordentlich grosser Bedeutung für das Wachstum von *M. perforans*.

Versuch 12. Der Einfluss von Aneurin, Pyrimidin und Thiazol sowie von Mangan auf das Wachstum von Marasmius perforans A (Tab. 24, Fig. 5).

Nährlösung A. 3 Reihen, siehe Tab. 24. 6 Parallelkolben.

Das Wachstum in der Reihe, in der Aneurin durch Pyrimidin und Thiazol ersetzt war, vollzog sich während der ersten 35 Tage etwas rascher als in der mit Aneurin. Im späteren Teil des Versuchs war der Unterschied zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes in den beiden Reihen ziemlich gross. Die Induktionsperiode trat in der Reihe mit Pyrimidin und Thiazol weniger deutlich hervor als in der mit Aneurin. In der Reihe mit Mn-Zusatz war eine Induktionsperiode kaum zu bemerken.

Tabelle 24.

Der Einfluss von Aneurin, Pyrimidin und Thiazol sowie von Mangan auf das Wachstum von *Marasmius perforans* A (Versuch 12).

Versuchszeit in Tagen	1 γ Aneurin je Kolben, kein Mn-Zusatz		0,626 γ Pyrimidin + 0,425 γ Thiazol je Kolben, kein Mn-Zusatz		1 γ Aneurin + 20 γ $MnCl_2 . 4 H_2O$ je Kolben	
	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓
15	3,1	5,3	4,8	5,1	7,1	5,1
25	6,4	4,9	8,9	4,8	19,2	4,8
35	8,2	4,8	18,0	4,5	33,4	4,5
48	37,5	4,3	76,8	4,4	82,1	3,9
55	55,6	4,2	95,1	3,5	109,7	3,6

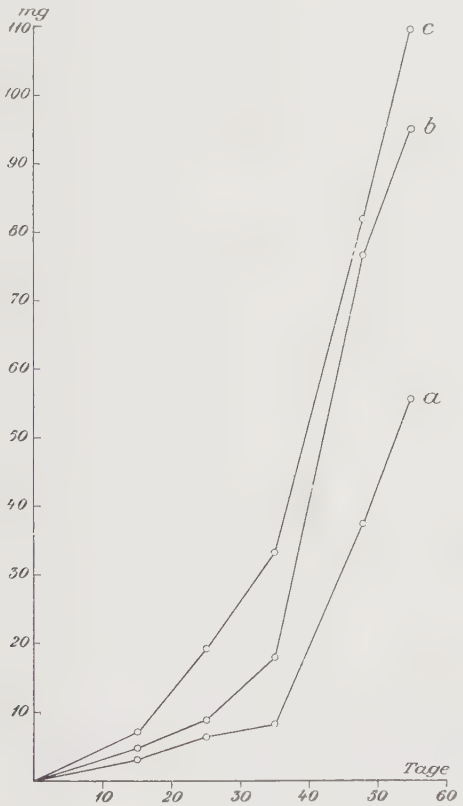

Fig. 5. Der Einfluss von Aneurin (*a*), Pyrimidin + Thiazol (*b*) sowie von Aneurin + Mangan (*c*) auf das Wachstum von *Marasmius perforans* A (Versuch 12).

Der Versuch zeigt, dass die sog. Induktionsperiode in verschiedener Weise mehr oder minder vollständig eliminiert werden kann. Der kräftige Effekt, der durch Zusatz von Mn erreicht wird, ist indes von besonderem Interesse. Wenn die Induktionsperiode, wie wir oben angenommen haben, hauptsächlich darauf beruht, dass ein für das Wachstum notwendiger Wuchsstoff während dieser Periode in suboptimalen Mengen gebildet wird, könnte man das Resultat von Versuch 12 so deuten, dass Mn die Synthese dieses Wuchsstoffs erleichtert oder seine Wirkung verstärkt. Weitere Untersuchungen über diese Fragen wären von grösstem Interesse.

Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Robbins' Untersuchungen über die Wachstumsbedingungen für *Phycomyces Blakesleeanus*. Dieser Forscher fand (Robbins 1939 a, b), dass *Phycomyces* ausser Aneurin einen anderen organischen Faktor für maximales Wachstum, Sporenkeimung sowie Gameten- und Zygotenbildung braucht. Diese unbekannte Substanz, für die Robbins die Bezeichnung Faktor Z eingeführt hat, besteht aus mindestens zwei Komponenten (Robbins & Hamner 1940). Sie wird von dem Pilz selbst aus den elementaren Bestandteilen der Nährlösung gebildet. Die Intensität der Synthese beruht unter anderm auf dem Alter des Myzels und scheint unter gewissen Bedingungen zu schwach zu sein, als dass das Wachstum mit maximaler Geschwindigkeit stattfinden könnte (Robbins 1940).

Nach Melin (1943, 1944) ist es wahrscheinlich, dass Robbins' Z-Faktor ziemlich allgemein in verschiedenen Arten von Streumaterial vorkommt und dass er eine wichtige Rolle für verschiedene Bodenpilze spielt, welche in mehreren Fällen diesen Faktor in suboptimaler Menge bilden.

Untersuchungen über den Einfluss des von *Phycomyces* gebildeten Z-Faktors auf das Wachstum von *Marasmius perforans* habe ich nicht ausgeführt. Jedoch möchte ich auf die Möglichkeit hinweisen, dass es ausser Biotin der Z-Faktor ist, der in suboptimaler Menge von *M. perforans* gebildet wird, und dass die unzureichende Synthese dieser Substanzen die Ursache der Induktionsperiode bei den Wachstumsversuchen mit dem Pilze ist. Es hat den Anschein, dass bei gewissen Stämmen (z. B. Stamm B) der Biotinbedarf, bei andern (z. B. Stamm E) der Bedarf an dem unbekannten Faktor dominiert. Bei langer Züchtung auf synthetischem Substrat, das keinen andern Wuchsstoff als Aneurin enthält, scheint durch einen Anpassungsprozess das Vermögen, den letztgenannten Faktor zu synthetisieren, gesteigert zu werden.

2. Aneurin als wachstumsbegrenzender Faktor.

Der Bedarf der Pilze an Wuchsstoffen ist im vorhergehenden vom qualitativen Gesichtspunkt behandelt worden. Im folgenden soll die quantitative Wirkung des Aneurins und Biotins besprochen werden. Die Fragestellung ist in diesem Fall: Kann bei Anwesenheit einer gewissen Quantität eines dieser Wuchsstoffe bloss eine gewisse, durch diese Quantität bestimmte Myzelmenge gebildet werden?

a. *Methodisches.*

Seitdem Liebig (1855, S. 105) sein sog. Minimumgesetz aufgestellt hat, hat sich die Auffassung von dem Zusammenspiel der wachstumsbegrenzenden Faktoren dank den Untersuchungen von Mitscherlich, Baule u. a. wesentlich verändert (Mitscherlich 1921, vgl. auch die zusammenfassende Arbeit von Romell 1926). Die moderne Ansicht in dieser Frage lässt sich vielleicht am einfachsten durch Liebschers schon 1895 (S. 216) formuliertes „Optimumgesetz" wiedergeben: „Die Pflanze kann den im Minimum vorhandenen Produktionsfaktor zu um so grösserer Produktion benutzen, je mehr die anderen Produktionsfaktoren sich für sie im Optimum befinden." Die Gültigkeit dieses Satzes bei Züchtungsversuchen mit Pilzen ergibt sich u. a. aus Pringsheims (1914) und Niethammers (1925) Arbeiten.

Will man experimentell den maximalen Wirkungsgrad eines Produktionsfaktors studieren, so muss man also darauf sehen, dass alle übrigen Faktoren so weit wie möglich optimale Werte erhalten, während dem Faktor, den man untersuchen will, ganz niedrige, suboptimale Werte zuerteilt werden.

Ausgehend von diesem Gedankengang, hat Fries (1938) eine Methode für das Studium des Einflusses von Wuchsstoffen auf Pilze ausgearbeitet, mit der er in erster Linie entscheiden konnte, ob ein Zusatz eines bestimmten Wuchsstoffs absolut notwendig für die Entwicklung der Pilze war, und durch die er, wenn es sich so verhielt, auch einen zahlenmässigen Ausdruck für den Wirkungsgrad des Wuchsstoffs erhielt.

Bei dieser Methode werden die Pilze in einer Nährlösung gezüchtet, die, mit Überschuss des betreffenden Wuchsstoffs versetzt, eine üppige Entwicklung des Myzels gestattet. Bei den Versuchen wird der Wuchsstoff indes in so kleinen Mengen zugesetzt, dass die Myzelerzeugung bloss einen Bruchteil der Produktion erreicht, welche bei Anwesenheit von Überschuss desselben Wuchsstoffs möglich ist. Die Versuche werden als Zeitserien vorgenommen, wodurch die Wachstumskurven der Objekte bestimmt werden können. Wenn das Wachstum zum Stillstand kommt,

wird ein Überschuss des Wuchsstoffs zugesetzt. Wenn dieser Zusatz zur Folge hat, dass das Wachstum wieder beginnt, kann man mit Sicherheit den Schluss ziehen, dass das erste Aufhören des Wachstums darauf beruhte, dass der Wuchsstoff verbraucht war, und dass den Pilzen unter den gewählten Versuchsbedingungen gänzlich die Fähigkeit fehlt, selbst den betreffenden Wuchsstoff zu bilden, d. h. dass sie absolut heterotroph in bezug auf diesen Wuchsstoff sind. Unter der Voraussetzung, dass die mit der suboptimalen Wuchsstoffmenge erhaltene Myzelmenge klein ist, kann man annehmen, dass die übrigen Produktionsfaktoren annähernd optimal geblieben sind, und dass also keine anderen Faktoren als der Wuchsstoff wesentlich begrenzend auf das Wachstum gewirkt haben. Man kann dann voraussetzen, dass das Verhältnis zwischen der gebildeten Myzelmenge und der verbrauchten Wuchsstoffmenge das maximale Wirkungsvermögen des Wuchsstoffs ausdrückt.

Fries studierte nach dieser Methode hauptsächlich die Wirkung von Aneurin auf das Wachstum verschiedener Pilze, vor allem Polyporazeen, unter denen er mehrere absolut aneurinheterotrophe Arten fand. Der Myzel-Aneurin-Quotient (l. c., S. 94) war für aneurinheterotrophe Pilze mit ganz verschiedener systematischer Stellung ungefähr derselbe, nämlich etwa $1 \cdot 10^6$. Melin & Nyman (1940) bedienten sich derselben Methode beim Studium des Aneurinbedarfs verschiedener Mykorrhizapilze. Auch unter diesen Pilzen fanden sich absolut aneurinheterotrophe Arten. Kürzlich hat Fries (1942, 1943 c) mit derselben Methodik nachgewiesen, dass Vitamin B_6 (Adermin) ein notwendiger Wuchsstoff für verschiedene *Ophiostoma*-Arten ist.

Wie oben bemerkt, hat Schopfer bereits 1935 (Schopfer 1935 b) die quantitative Wirkung von Aneurin auf *Phycomyces Blakesleeanus* konstatiert. Um zu ermitteln, ob das Aneurin beim Stickstoffumsatz des Pilzes mitwirkt, führte Schopfer (l. c.) umfassende Versuche aus, bei denen die Konzentration des Aneurins und der Stickstoffquelle, des Asparagins, gleichzeitig variiert wurde. Bei jeder Asparaginkonzentration nahm das Myzeltrockengewicht anfangs mit der Aneurinmenge zu. Nachdem eine der zugänglichen Stickstoffmenge entsprechende Myzelmenge gebildet worden war, hatte ein weiterer Aneurinzusatz keine Wirkung.

Die Aneurinmenge, die gerade erforderlich ist, um bei einer gegebenen Asparaginkonzentration die maximale Myzelmenge zu bilden, bezeichnet Schopfer als „optimal" („dose optimale" oder „dose critique"). Der aus der „optimalen" Aneurinmenge und der entsprechenden Myzelmenge berechnete Aneurin-Myzel-Quotient hat nach Schopfer einen von der Asparaginkonzentration unabhängigen und nahezu konstanten Wert von $5 \cdot 10^{-6}$. Dies bedeutet nach ihm, dass bei Zusatz einer „optimalen" Aneurinmenge

ca. 5 mγ Aneurin zur Bildung von 1 mg Myzel notwendig sind. Diese Aneurinmenge betrachtet SCHOPFER als eine biologische Konstante, die „*Phycomyces*-Einheit".

Aus SCHOPFERS Versuchen geht indes hervor, dass suboptimale Aneurinmengen um so besser von dem Pilz ausgenutzt werden, je näher dem Optimum die Asparaginkonzentration liegt. Die gegen steigende Vitaminmenge aufgezeichneten Erntekurven, die je für sich bestimmten Asparaginkonzentrationen entsprechen, haben vom Nullpunkt an getrennten Verlauf und gehen mit einer gleichmässigen Krümmung in horizontale Linien über, welche zum Ausdruck bringen, dass die Stickstoffmenge allein das Wachstum begrenzt (SCHOPFER 1935 b, S. 518). Einen bestimmten Punkt anzugeben, in dem jede Kurve horizontal wird, ist sehr schwierig. Infolgedessen ist die Feststellung der „optimalen" Aneurinmenge bis zu gewissem Grade willkürlich und die Berechnung der *Phycomyces*-Einheit in demselben Grade unsicher.

Ausserdem muss man gegen SCHOPFERS Versuche einwenden, dass aus ihnen keineswegs sicher hervorgeht, dass die „optimale" Aneurinmenge in den verschiedenen Fällen wirklich bei der Myzelbildung verbraucht worden ist. SCHOPFERS Kurven zeigen, dass der Effekt des Aneurins rasch abnimmt, wenn sich seine Konzentration dem optimalen Wert nähert. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass bei dem sog. Optimum das Aneurin *nicht* verbraucht worden ist. In den Fällen, wo die Asparaginkonzentration höchstens 1 $^0/_{00}$ beträgt, kann man dagegen mit Sicherheit sagen, dass der *Stickstoff* in dem genannten Punkt verbraucht ist. Die optimale Aneurinmenge, mit der SCHOPFER bei Bestimmung seiner sog. *Phycomyces*-Einheit rechnet, umfasst also wahrscheinlich teils eine Quantität Aneurin, die der Pilz bei der Myzelbildung verbraucht, teils eine Quantität, die er — infolge Stickstoffmangels — nicht auszunutzen vermag. Der Wert der *Phycomyces*-Einheit als biologische Konstante erscheint mir deshalb zweifelhaft. Endlich sei darauf hingewiesen, dass die Versuchsresultate keine Schlüsse in bezug auf den Zusammenhang des Aneurins mit dem Stickstoffumsatz gestatten, was SCHOPFER auch selbst später zugegeben hat (SCHOPFER 1937 a, S. 422; 1939, S. 36).

Meiner Ansicht nach ist es am richtigsten, beim Studium der quantitativen Wirkungen des Aneurins solche Versuchsbedingungen anzustreben, dass die Wirkung des Wuchsstoffs maximal wird. Bei meinen Untersuchungen über die quantitative Wirkung des Aneurins auf die *Marasmius*-Arten wählte ich deshalb eine Methodik, die grundsätzlich mit dem oben erwähnten Verfahren von FRIES übereinstimmt, d. h. das Aneurin wurde in suboptimalen Mengen zugesetzt, während allen übrigen Faktoren soweit wie möglich optimale Werte zuerteilt wurden.

Um bei den Experimenten möglichst gute Wachstumsbedingungen für die verwendeten Pilze zu schaffen, fand ich es indes notwendig, die von FRIES angewandte Methodik in gewissen Beziehungen zu modifizieren.

Wie bereits auf S. 41 bemerkt, wurde bei sämtlichen Versuchen mit Nährlösungen darauf gesehen, dass die Impfstücke auf der Oberfläche schwammen. Hinsichtlich der Zusammensetzung der Nährlösung habe ich einleitend bemerkt, dass ich im Verlauf der Untersuchung imstande war, dieselbe sukzessiv zu ergänzen und zu verbessern. Als ich im Begriff stand, meine Untersuchung über die quantitative Wirkung des Aneurins auf die verschiedenen *Marasmius*-Arten zu beginnen, hatte ich durch Studien über den Einfluss verschiedener Metalle auf die Pilze gefunden, dass sowohl Zn als Ca und Mn grosse Bedeutung für dieselben haben (S. 116 ff.). Der Nährlösung, die ich bei dieser Untersuchung benutzte, setzte ich deshalb ausser Ca, welches auch in der von FRIES verwendeten Nährlösung enthalten ist, auch Zn und Mn zu.

Ausserdem vereinfachte ich die Methodik von FRIES dadurch, dass ich die suboptimalen Aneurinmengen vor dem Autoklavieren der Nährlösung zusetzte. Gegen dieses Verfahren kann man einwenden, dass der Wuchsstoff beim Autoklavieren eine gewisse Zersetzung erfahren kann. Die Zersetzungsgeschwindigkeit des Aneurins ist indes stark vom pH der Lösung abhängig. In saurer Lösung ist es bedeutend stabiler als in neutraler oder alkalischer (VOGEL 1943, S. 219). Die von mir benutzte Nährlösung war schwach sauer, und das Autoklavieren erfolgte verhältnismässig rasch. Deshalb dürfte das Aneurin nur unbedeutend beeinflusst worden sein. Eine durch die Erhitzung verursachte Spaltung des Aneurins in Pyrimidin und Thiazol ist übrigens in diesem Fall ohne Bedeutung, da ja diese beiden Verbindungen zusammen nach Versuch 7 Aneurin für die fraglichen Pilze vollständig ersetzen können. Bemerkt sei auch, dass FRIES (1938, S. 93) bei einem vergleichenden Versuch durch Zusatz von 10 mγ Aneurin je Kolben ein und dieselbe Myzelmenge des absolut aneurinheterotrophen Pilzes *Polyporus adustus* erhielt, gleichviel ob das Vitamin autoklaviert worden war oder nicht.

b. *Versuche.*

In den Versuchen 13 und 14 studierte ich das Wachstum der verschiedenen *Marasmius*-Arten in Gegenwart suboptimaler Aneurinmengen.

Eine eingehende Untersuchung über die Abhängigkeit des Aneurineffekts von der Zusammensetzung der Nährlösung im übrigen habe ich nicht vorgenommen. Da ich bei den Untersuchungen über den Effekt suboptimaler Aneurinmengen eine Nährlösung zu benutzen gedachte, die mit Ca und Mn versetzt war, und da diese Metalle bei meinen früheren

Aneurinversuchen nicht zugesetzt worden waren, beschloss ich indes, erst in einem besonderen Versuch, wenn auch sehr unvollständig, ihren Einfluss auf den Aneurineffekt zu studieren. Als Objekt für diese Untersuchung wählte ich *M. scorodonius*.

Versuch 13. Der Einfluss von 10 mγ Aneurin auf das Wachstum von Marasmius scorodonius A in einer Nährlösung mit und ohne Zusatz von Kalzium und Mangan (Tab. 25, Fig. 6).

Grundlösung: Nährlösung A.

Reihen:

I. Kein Zusatz von Ca und Mn.
   a) Kein Zusatz von Aneurin.
   b) 10 mγ Aneurin je Kolben.

II. Zusatz von 0,5 mMol $CaCl_2 . 6H_2O$ + 0,05 mMol $MnSO_4 . 4H_2O$ je Liter Nährlösung.
   a) Kein Zusatz von Aneurin.
   b) 10 mγ Aneurin je Kolben.
   4 Parallelkolben.

In den Kontrollkolben (Reihe I a und II a) betrug das Myzeltrockengewicht nach 85 Tagen in der Reihe ohne Metallzusatz 0,7 mg und in der mit Metallzusatz 4,7 mg. In Gegenwart von 10 mγ Aneurin nahm das Myzeltrockengewicht langsam zu, bis es nach 55 Tagen in der Reihe ohne Metallzusatz 12,3 mg und in der mit Metallzusatz 25,7 mg betrug. Hierauf hörte das Wachstum auf. Als nach 67 Tagen in 4 Kolben aus jeder dieser Reihen je 1 γ Aneurin zugesetzt wurde, begann das Myzel in diesen Kolben wieder zu wachsen, und nach weiteren 18 Tagen hatte die Myzelmenge auf 17,8 mg (kein Metallzusatz) bzw. 37,4 mg (Metallzusatz) zugenommen.

Da die Wachstumshemmung in den beiden Reihen durch erneuten Aneurinzusatz behoben werden konnte, muss sie in beiden Fällen durch Aneurinmangel verursacht worden sein. Der Pilz konnte also nicht selbst Aneurin bilden, sondern erwies sich als absolut aneurinheterotroph, mochte nun die Nährlösung mit Ca und Mn versetzt sein oder nicht. Dagegen steigerten diese Metalle die Fähigkeit des Pilzes zur Ausnutzung des Aneurins erheblich: durch einen Zusatz von Ca und Mn verdoppelte sich die Myzelmenge, die maximal in Anwesenheit von 10 mγ Aneurin gebildet werden konnte. Noch auffallender war der Unterschied zwischen den Myzelmengen in den beiden Kontrollen.

Die Ursache des Metalleffekts muss gewesen sein, dass der Gehalt der Nährlösung an Ca und Mn suboptimal war, wenn nicht Salze dieser Metalle besonders zugesetzt wurden. Ohne solchen Zusatz konnte der Pilz deshalb den im Minimum vorhandenen Produktionsfaktor, das Aneurin, nicht so gut ausnutzen, wie wenn die genannten Metalle zugesetzt wurden.

Tabelle 25.

Der Einfluss von 10 mγ Aneurin auf das Wachstum von *Marasmius scorodonius* A in einer Nährlösung mit und ohne Zusatz von Kalzium und Mangan (Versuch 13).

Versuchszeit in Tagen	Kein Zusatz von Ca und Mn		Zusatz von Ca und Mn	
	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓
15	4,0	5,1	7,4	4,9
25	6,4	4,9	14,9	4,8
35	8,6	4,9	16,8	4,8
45	10,3	4,7	21,5	5,0
55	12,3	4,7	25,7	5,3
65	11,0	4,7	23,8	5,3
75	11,6	4,7	25,6	5,8
85	10,5	4,7	24,8	5,8
67 + 18[1]	17,8	4,6	37,4	5,6

Kontrollen: Ohne Ca und Mn 0,7 mg nach 85 Tagen.
Mit » » » 4,7

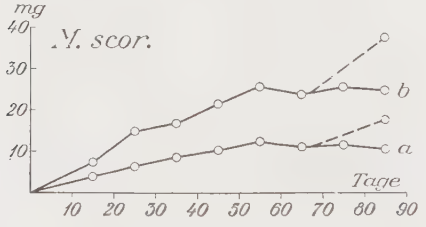

Fig. 6. Der Einfluss von 10 γ Aneurin auf das Wachstum von *Marasmius scorodonius* A in synthetischer Nährlösung mit (*b*) und ohne (*a*) Zusatz von Ca und Mn; – – – – –: Wachstum nach Zusatz von 1 γ Aneurin je Kolben (Versuch 13).

Wie kommt es, dass das Myzel in der Kontrolle so kräftig auf den Metallzusatz reagierte? Hier muss ja die Disproportion zwischen dem Gehalt der Lösung und des Impfmaterials an den Metallen einerseits und an Aneurin andererseits geringer gewesen sein als in der Reihe mit 10 mγ Aneurin. Folglich müsste auch die relative Wirkung der Metalle auf den Myzelertrag schwächer gewesen sein als in der letztgenannten Reihe. Diese Frage muss hier unbeantwortet bleiben. Indes möchte ich in diesem Zu-

[1] Nach so vielen Tagen, wie die erste Zahl angibt, wurde jedem dieser Kolben 1 γ Aneurin zugesetzt. Nach weiteren so vielen Tagen, wie die zweite Zahl angibt, wurden die Kolben abgeerntet.

sammenhang daran erinnern, dass FRIES (1938) konstatiert hat, dass der absolut aneurinheterotrophe Pilz *Valsa pini* bei Züchtung in einer biotinhaltigen, aber aneurinfreien Lösung eine Myzelmenge bildete, die überraschend gross im Verhältnis zu der Menge war, welche gleichzeitig in der biotin- und aneurinfreien Kontrollreihe erhalten wurde. Ebenso verhielt sich bei meinen eigenen Untersuchungen *Marasmius androsaceus* (Tab. 16, S. 52), der sich, wie wir später sehen werden, auch als absolut aneurinheterotroph erwies. Es ist ja nicht ausgeschlossen, dass beide oder eines der Metalle Ca und Mn von Bedeutung für eine durch den Pilz bewirkte Synthetisierung eines organischen Wachstumsfaktors sind, der seinerseits einen gleichartigen Effekt hat wie das Biotin in der Versuchen mit *Valsa pini* und *Marasmius androsaceus*.

Berechnet man nach FRIES (l. c.) den sog. Myzel-Aneurin-Quotienten für *M. scorodonius* in Versuch 13, so erhält man bei Korrektion unter Berücksichtigung der Kontrollwerte in der Reihe mit Ca und Mn $2{,}1 \cdot 10^6$ und in der ohne diese Metalle $1{,}2 \cdot 10^6$. Die Versuchsresultate zeigen also, dass man die Metalle Ca und Mn zusetzen muss, wenn man eine Nährlösung zu erhalten wünscht, in der der Effekt des Aneurins maximal ist.

Versuch 14. Der Einfluss von 10 mγ Aneurin auf das Wachstum verschiedener Marasmius-Arten. (Tab. 26, Fig. 7–8.)

Nährlösung A mit Zusatz von 0,5 mMol $CaCl_2 . 6\,H_2O$ und 0,05 mMol $MnSO_4 . 4\,H_2O$ je Liter. Jedem der Kolben, die mit *M. androsaceus* geimpft wurden, wurden 10 mγ Biotin zugesetzt.

Reihen: a) Kontrolle.
b) 10 mγ Aneurin je Kolben.
4 Parallelkolben.

Wie die Kurven in Fig. 7–8 veranschaulichen, verhielten sich die verschiedenen *Marasmius*-Arten in etwas ungleicher Weise gegenüber der bei dem Versuch verwendeten Aneurinkonzentration. Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen.

Ein typischer Repräsentant für die eine dieser Gruppen ist *M. epiphyllus*. Bei diesem Pilz hörte das Wachstum nach ca. 40 Tagen auf, als 29 mg Myzel gebildet worden waren. Hierauf begann die Myzelmenge abzunehmen. Als nach 50 Tagen Überschuss von Aneurin zugesetzt wurde, begann der Pilz indes von neuem rasch zu wachsen.

Dieses Versuchsresultat muss so gedeutet werden, dass der wachsende Pilz Aneurin verbrauchte, und dass das Wachstum schliesslich infolge von Aneurinmangel zum Stillstand kam. Allmählich verursachte der Aneurinmangel Autolyse des Myzels. Durch erneuten Aneurinzusatz konnte diese Autolyse jedoch sofort behoben und das Wachstum wieder in Gang gebracht werden.

Tabelle 26.

Der Einfluss von 10 mγ Aneurin auf das Wachstum verschiedener *Marasmius*-Arten (Versuch 14).

a) *M. alliaceus.*

Versuchszeit in Tagen	10	20	30	40	55	80
Trockengewicht in mg	1,5	9,4	16,9	35,8	51,1	70,3
pH: 5,5 →	5,4	5,0	4,8	4,7	4,6	4,6

Kontrolle: 4,0 mg nach 30 Tagen.
9,1 » » 45 »
6,5 » » 60 »

b) *M. androsaceus* B.

Versuchszeit in Tagen	10	25	35	45	55	65	75	85	57 + 18[1]
Trockengewicht in mg	6,3	14,6	17,4	24,3	23,0	19,0	20,2	20,5	41,8
pH: 5,5 →	4,6	4,4	4,4	4,4	4,6	4,8	5.2	5,2	4,4

Kontrolle: 4,1 mg nach 85 Tagen.

c) *M. chordalis.*

Versuchszeit in Tagen	10	20	30	40	50	60	75	60 + 15[1]
Trockengewicht in mg	2,1	6,3	11,4	13,1	14,6	14,3	15,0	46,3
pH: 5,5 →	5,4	5,0	4,9	4,7	4,6	4,6	4,5	4,3

Kontrolle: 2,0 mg nach 75 Tagen.

d) *M. epiphyllus.*

Versuchszeit in Tagen	10	20	30	40	50	62	50 + 12[1]
Trockengewicht in mg	4,7	10,9	16,2	29,4	22,6	17,8	61,4
pH: 5,5 →	5,2	4,8	4,5	4,3	4,0	4,0	4,2

Kontrolle: 2,5 mg nach 62 Tagen.

e) *M. foetidus* A.

Versuchszeit in Tagen	10	20	33	45	60	70	83	70 + 13[1]
Trockengewicht in mg	2,5	5,0	9,4	13,8	15,4	17,0	16,0	29,0
pH: 5,5 →	5,0	4,6	4,3	4,3	4,2	4,1	4,1	3,7

Kontrolle: 3,9 mg nach 83 Tagen.

[1] Siehe Fussnote S. 74.

f) *M. fulvobulbillosus* B.

Versuchszeit in Tagen	10	20	30	40	50	60	70	85
Trockengewicht in mg	1,8	6,1	13,2	16,2	16,5	21,3	26,4	33,3
pH: 5,5 →	5,4	5,1	4,9	4,8	4,9	4,5	4,4	4,4

Kontrolle: 2,9 mg nach 85 Tagen.

g) *M. graminum.*

Versuchszeit in Tagen	10	20	25	30	35	40	45	54	45 + 9[1]
Trockengewicht in mg	8,4	16,2	18,7	19,7	21,6	22,0	21,9	26,9	94.6
pH: 5,5 →	4,8	4,6	4,5	4,5	4,5	4,4	4,4	4,3	4,2

Kontrolle: 3,0 mg nach 20 Tagen.
1,6 » » 40 »

h) *M. perforans* A.

Versuchszeit in Tagen	10	20	30	40	50	60	71	60 + 11[1]
Trockengewicht in mg	2,3	5,8	10,4	13,1	14,2	13,0	13,6	37,8
pH: 5,5 →	5,1	4,5	4,3	4,3	4,2	4,2	4,3	4,1

Kontrolle: 3,3 mg nach 71 Tagen.

i) *M. peronatus* A.

Versuchszeit in Tagen	10	20	30	40	55	65	78	86	97
Trockengewicht in mg	1,1	4,5	13,4	22,8	24,7	3 1,1	37,0	41,4	48,0
pH: 5,5 →	5,4	4,8	4,4	4,3	4,0	4,0	4,0	4,0	3,9

Kontrolle: 3,0 mg nach 97 Tagen.

j) *M. putillus.*

Versuchszeit in Tagen	10	20	30	40	55	65	83	65 + 18[1]
Trockengewicht in mg	1,5	2,9	6,4	8,5	14,9	14,0	15,6	65,5
pH: 5,5 →	5,0	4,8	4,6	4,6	4,3	4,5	4,4	3,9

Kontrolle: 1,9 mg nach 83 Tagen.

[1] Siehe Fussnote S. 74.

k) *M. ramealis* C.

Versuchszeit in Tagen	15	30	45	55	65	75	85	95	65 + 10[1]
Trockengewicht in mg	4,1	12,6	18,1	22,6	20,1	22,6	25,2	29,9	44,3
pH: 5,5 →	4,9	4,4	4,4	4,3	4,4	4,3	4,3	4,2	4,2

Kontrolle: 3,8 mg nach 30 Tagen.
5,8 » » 55 »
6,2 » » 75 »
7,4 » » 85 »

l) *M. rotula* C.

Versuchszeit in Tagen	10	20	30	40	50	62	50 + 12[1]
Trockengewicht in mg	5,0	13,5	22,4	24,4	25,1	18,2	38,9
pH: 5,5 →	5,3	4,8	4,7	4,6	4,4	4,3	4,3

Kontrolle: 1,3 mg nach 62 Tagen.

Der Pilz gehört hinsichtlich seines Verhaltens zu Aneurin zu demselben Typus wie *Polyporus annosus* und *P. benzoinus*, deren Wachstum in Anwesenheit suboptimaler Aneurinmengen von Fries (1938) studiert worden ist. Auch bei diesen Pilzen trat, nachdem das Aneurin verbraucht war, Autolyse ein. *Phycomyces Blakesleeanus*, das klassische Objekt bei Untersuchungen über die Aneurinwirkung, soll in gewissen Nährlösungen nicht autolysiert werden, nachdem das Aneurin verbraucht ist (Schopfer 1935 b, vgl. Schopfer 1939, S. 28, Malm & Lundin 1941), während er in Lösungen von anderer Zusammensetzung bei Aneurinmangel deutlicher Autolyse verfällt (Fries l. c.). Tritt Autolyse ein, nachdem das Aneurin verbraucht ist, so kann dies als ein sehr sicheres Zeichen dafür angesehen werden, dass dem Versuchsobjekt unter den herrschenden Versuchsbedingungen die Fähigkeit zur Bildung von Aneurin gänzlich fehlt. Die genannten Pilze können deshalb ohne Bedenken als absolut aneurinheterotroph bezeichnet werden (Fries l. c., S. 158).

Auch bei *M. rotula* und bis zu gewissem Grade bei *M. androsaceus* war, nachdem das Wachstum infolge von Aneurinmangel aufgehört hatte, eine gewisse Abnahme des Myzelgewichts festzustellen. Auch diese Pilze erwiesen sich also deutlich als absolut aneurinheterotroph.

Zu derselben Gruppe dürften mit gewissem Vorbehalt auch *M. chordalis*, *M. foetidus*, *M. perforans* und *M. putillus* zu rechnen sein. Nach 50–70 Tagen kam das Wachstum bei diesen Pilzen zum Stillstand, nachdem sich eine Myzelmenge von 14–17 mg gebildet hatte. Hierauf blieb das

[1] Siehe Fussnote S. 74.

Myzelgewicht während der weiteren Dauer des Versuchs unverändert. Ein Zusatz von Aneurin im Überschuss hatte zur Folge, dass das Wachstum wieder begann.

Diese letztgenannten Pilze stehen hinsichtlich ihres Aneurinbedarfs dem von FRIES (l. c.) untersuchten Pilz *Polyporus adustus* am nächsten, der dadurch charakterisiert ist, dass seine Wachstumskurve unter dem Einfluss suboptimaler Aneurinmengen allmählich sehr langsam in eine horizontale Linie übergeht, und dass keine Autolyse eintritt. FRIES hält es nicht für ausgeschlossen, dass das Myzelwachstum bei dieser Art unter gewissen Umständen unabhängig von der zugesetzten Aneurinmenge weitergehen kann. Diese Möglichkeit kann auch bei den fraglichen *Marasmius*-Arten nicht ganz von der Hand gewiesen werden.

Für die *Marasmius*-Arten, die mit dem ebenerwähnten Vorbehalt als absolut aneurinheterotroph bezeichnet werden können, lassen sich nach den Versuchen 13 und 14 folgende Werte des Myzel-Aneurin-Quotienten berechnen:

M. androsaceus	$2{,}0 \cdot 10^6$
M. chordalis	$1{,}3 \cdot 10^6$
M. epiphyllus	$2{,}7 \cdot 10^6$
M. foetidus	$1{,}3 \cdot 10^6$
M. perforans	$1{,}1 \cdot 10^6$
M. putillus	$1{,}4 \cdot 10^6$
M. rotula	$2{,}4 \cdot 10^6$
M. scorodonius	$2{,}1 \cdot 10^6$

M. peronatus kann als Vertreter der zweiten der beiden oben genannten Gruppen betrachtet werden. Bei diesem Pilz betrug das Myzeltrockengewicht nach 40 Tagen 22,8 mg. Hierauf kam das Wachstum fast ganz zum Stillstand, und nach weiteren 15 Tagen hatte das Myzelgewicht bloss auf 24,7 mg zugenommen. Im späteren Teil des Versuchs nahm das Wachstum indes mit etwas grösserer Geschwindigkeit seinen Fortgang. Nach 97 Tagen, als die letzten Kolben des Versuchs abgeerntet wurden, hatten sich 48 mg Myzel gebildet. In der Kontrolle betrug die Myzelmenge nach derselben Zeit 3,0 mg.

Dass dieser Pilz zu den aneurinheterotrophen Arten gerechnet werden kann, ist klar. Ohne Aneurinzusatz bildete er nicht mehr Myzel als mehrere der absolut aneurinheterotrophen Arten. Dass das Wachstum nahezu aufhörte, nachdem ca. 23 mg Myzel gebildet worden waren, kann so gedeutet werden, dass die anfangs zugesetzte Aneurinmenge von 10 mγ verbraucht war. Dies würde einen Myzel-Aneurin-Quotienten von ca. $2 \cdot 10^6$ bedeuten (Korrektion im Hinblick auf die Kontrolle), d. h. einen Wert

von derselben Grössenordnung wie für die absolut aneurinheterotrophen Arten.

Ebenso wie *M. peronatus* verhielt sich *M. fulvobulbillosus*. Nach 40 Tagen hörte das Wachstum fast völlig auf, nachdem sich 16 mg Myzel gebildet hatten. Später setzte der Pilz sein Wachstum fort, und nach 85 Tagen betrug das Myzeltrockengewicht 33 mg. Wenn 16 mg als die Myzelmenge angesehen werden dürfen, die von 10 mγ Aneurin gebildet werden konnte, erhält man einen Myzel-Aneurin-Quotienten von $1{,}3 \cdot 10^6$ (Kontrolle 2,9 mg).

Auch *M. graminum* dürfte zu dieser Gruppe zu zählen sein. Bei die-

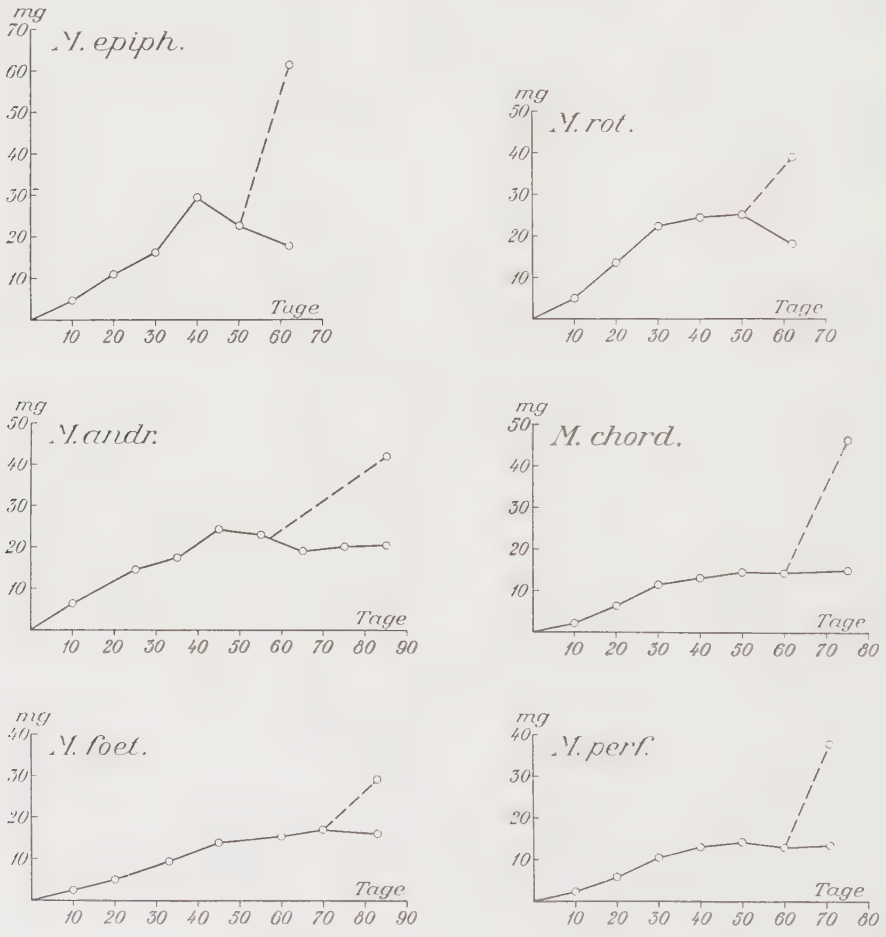

Fig. 7. Das Wachstum verschiedener *Marasmius*-Arten in synthetischer Nährlösung mit 10 mγ Aneurin je Kolben; – – – –: Wachstum nach Zusatz von 1 γ Aneurin je Kolben (Versuch 14).

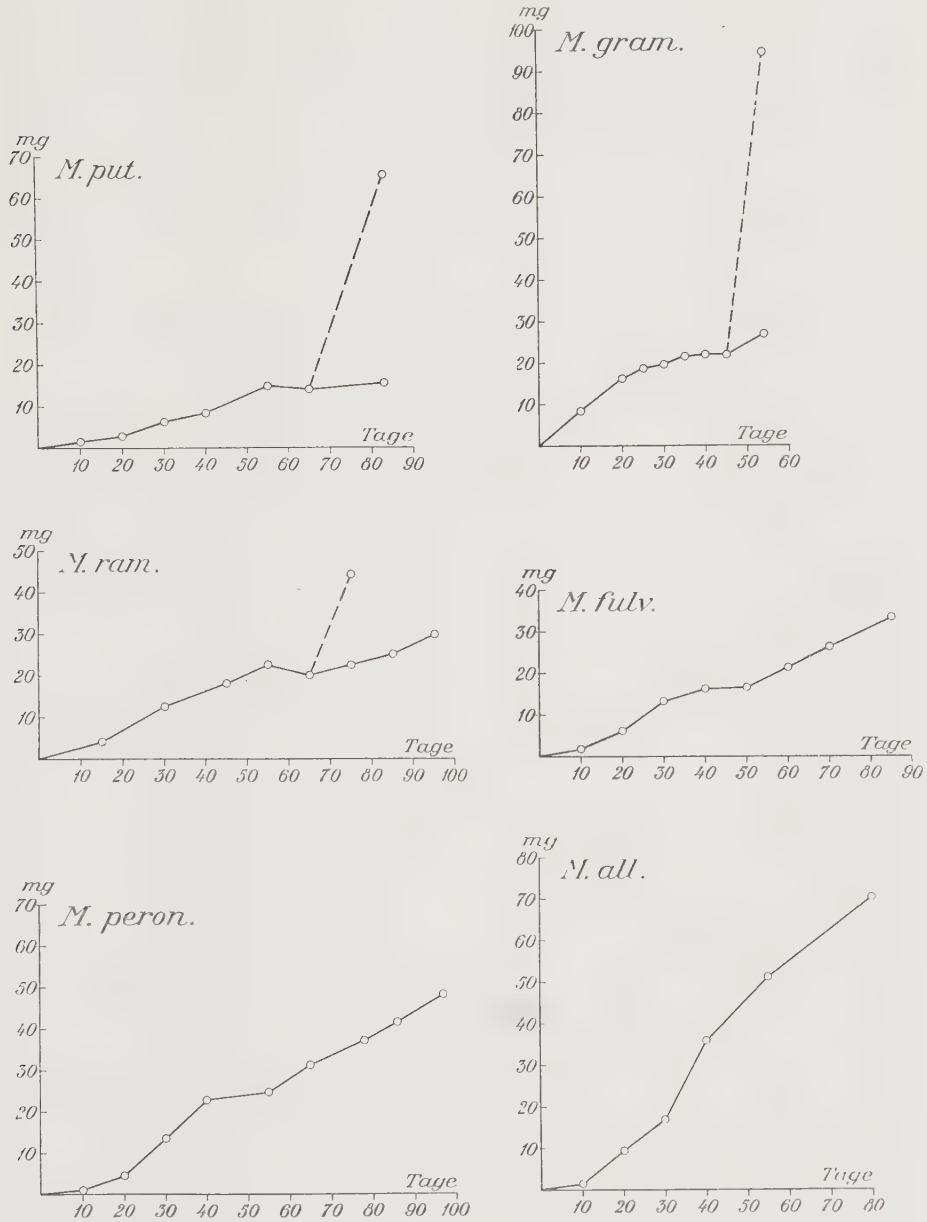

Fig. 8. Das Wachstum verschiedener *Marasmius*-Arten in synthetischer Nährlösung mit 10 mγ Aneurin je Kolben; – – – –: Wachstum nach Zusatz von 1 γ Aneurin je Kolben (Versuch 14).

sem Pilze hörte das Wachstum nach 35 Tagen auf, als 22 mg Myzel gebildet waren. Derselbe Wert des Myzeltrockengewichts wurde auch nach 40 und 45 Tagen erhalten. Nach weiteren 9 Tagen hatte indes das Trokkengewicht auf 27 mg zugenommen. Dass jedoch der Aneurinzugang für die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmend war, geht deutlich daraus hervor, dass ein Zusatz von 1 γ Aneurin, der nach 45 Tagen erfolgte, eine ausserordentlich rasche Entwicklung des Myzels herbeiführte: in 9 Tagen nahm die Myzelmenge auf 95 mg zu. Bei diesem Pilz betrug der Myzel-Aneurin-Quotient $1{,}9 \cdot 10^6$.

Noch komplizierter waren die Verhältnisse bei *M. ramealis*. Diese Art hatte nach 55 Tagen 23 mg Myzel gebildet. Während der nächsten 20 Tage blieb das Myzelgewicht unverändert, dann aber begann es wieder zuzunehmen und betrug nach 95 Tagen 30 mg. Auch bei diesem Pilz hatte ein Zusatz von 1 γ Aneurin, welcher nach 65 Tagen erfolgte, eine kräftige Wirkung, indem sich die Myzelmenge in 10 Tagen auf 44 mg vermehrte. *M. ramealis* bildete indes auch in der Kontrollreihe ziemlich grosse Mengen Myzel, und die Gewichtsziffern stiegen hier langsam, aber ununterbrochen während der ganzen Versuchsdauer. Ein Myzel-Aneurin-Quotient konnte deshalb nicht berechnet werden.

Die hohen Gewichtsziffern in der Kontrollreihe sind sehr schwer erklärlich. Nimmt man an, dass der Pilz in der aneurinfreien Nährlösung ein gewisses Vermögen hatte, Aneurin zu synthetisieren, so erscheint das zeitweilige Aufhören des Wachstums in der Reihe mit 10 mγ Aneurin sehr seltsam. Vielleicht liegt die Erklärung vielmehr darin, dass das Myzel von *M. ramealis* einen viskösen Schleim bildet, der nur in geringem Grade beim Waschen aus den Hyphen ausgelöst wird (vgl. unten *M. alliaceus*). Mit gewissem Bedenken rechne ich deshalb den Pilz zu der *M. peronatus*-Gruppe.

Wasser wurde in der Reihe mit *M. fulvobulbillosus* nach 60 Tagen und in den Reihen mit *M. peronatus* und *M. ramealis* nach 65 Tagen zugesetzt (vgl. S. 41). In der Reihe mit *M. graminum* erfolgte kein Wasserzusatz. Aus Tab. 26 und Fig. 8 geht hervor, dass das Wachstum bei *M. fulvobulbillosus* und *M. peronatus* nach dem ersten Aufhören schon wieder in Gang gekommen war, als der Wasserzusatz stattfand. Der Wasserzusatz kann also bei diesen Pilzen keinen Einfluss auf die Form der Wachstumskurve gehabt haben. Bei *M. ramealis* begann das Wachstum nach dem ersten Stillstand gleichzeitig mit dem Wasserzusatz. In diesem Fall ist ein Zusammenhang zwischen dem letzteren und der Wiederaufnahme des Wachstums denkbar. Da indes bei den übrigen Arten dieser Gruppe kein derartiger Zusammenhang bestand, ist es keineswegs notwendig, einen solchen für *M. ramealis* anzunehmen.

Nach Fries (1938) verhielt sich die Polyporazee *Daedalea unicolor* gegen suboptimale Aneurinmengen ungefähr ebenso, wie es oben für *M. peronatus*, *M. fulvobulbillosus*, *M. graminum* und *M. ramealis* beschrieben wurde. Als *Daedalea unicolor* in 25 ccm Nährlösung mit 10 mγ Aneurin gezüchtet wurde, trat, nachdem sich eine Myzelmenge von 21–24 mg gebildet hatte, ein gewisser Stillstand des Wachstums ein, welches jedoch nach einiger Zeit mit grösserer Geschwindigkeit seinen Fortgang nahm. Ohne Aneurinzusatz wurde kein Wachstum erzielt.

Fries (l. c., S. 169) nimmt an, dass der Pilz ein ganz geringes, auf aneurinfreiem Substrat ungenügendes Vermögen besitzt, Aneurin zu synthetisieren, und dass das Aneurin, welches gebildet wird, in solchem Umfang in die Nährlösung diffundiert, dass die Aneurinkonzentration in den Zellen nicht die Höhe erreicht, welche erforderlich ist, damit der Pilz weiterwachsen kann. Nur wenn die Aneurinkonzentration des Mediums anfangs einen gewissen Mindestwert hat, ist es dem Pilz möglich, unabhängig vom Aneurin als Milieufaktor weiterzuwachsen.

Der Verlauf der Wachstumskurven lässt sich indes meiner Ansicht nach nicht ganz auf diese Weise erklären. Schopfer (1936), Nielsen & Hartelius (1937) sowie Hartelius & Nielsen (1938) haben eine sehr hohe Affinität zwischen Wuchsstoffen einerseits sowie lebendem Myzel und Zellen verschiedener Pilze andererseits nachgewiesen. Es ist deshalb wenig wahrscheinlich, dass Aneurin in so grossen Mengen aus einem Myzel ausdiffundieren könnte, dass das Wachstum des Myzels dadurch unmöglich gemacht wird. Dass das Wachstum erst ganz oder fast ganz aufhört, um dann allmählich wieder in Gang zu kommen, scheint sich vielmehr dadurch erklären zu können, dass eine physiologische Veränderung eintritt, welche bedeutet, dass die Pilze selbst das für das Wachstum nötige Aneurin zu synthetisieren beginnen. Wenn die Voraussetzung für eine solche Aneurinsynthese nur die wäre, dass die Aneurinkonzentration des Mediums anfangs einen gewissen Mindestwert hätte, so müssten die Pilze ja, wenn sie auf aneurinreichen Substraten wie Malzagar wachsen, aneurinautotroph sein. Es erscheint mir wahrscheinlicher, dass sie in diesem Fall aneurinheterotroph sind, und dass sie nur dann zu Aneurinautotrophie übergehen können, wenn sie in einer Lösung gezüchtet werden, welche anfangs eine gewisse suboptimale Menge Aneurin enthält, deren Aneurinkonzentration aber allmählich durch das Wachstum der Pilze immer schwächer wird (vgl. S. 100).

Eine Sonderstellung unter den untersuchten *Marasmius*-Arten nimmt *M. alliaceus* ein. Bei Anwesenheit von 10 mγ Aneurin wuchs dieser Pilz ununterbrochen während der ganzen Versuchszeit und hatte nach 80 Tagen nicht weniger als 70 mg Myzel gebildet. Auch in der Kontrollreihe bil-

dete er wie *M. ramealis* eine recht grosse Myzelmenge, aber die Gewichtsziffern dieser Reihe sanken doch etwas nach 45 Tagen.

M. alliaceus bildet in Flüssigkeitskultur teils ein lockeres, ziemlich buschiges Luftmyzel, teils ein submerses Myzel. Unter gewissen Bedingungen sondert das letztere einen Schleim von gallertartiger, ziemlich fester Konsistenz ab. Bei mikroskopischer Untersuchung eines solchen submersen Myzels findet man, dass die Hyphen, welche normales Aussehen haben, in einer strukturlosen, klaren Masse eingebettet liegen. Nach einer gewissen Eintrocknung eines solchen Myzels bekommt es eine fast knorpelartige Konsistenz.

Bei zahlreichen Versuchen mit *M. alliaceus*, wobei bald der eine, bald der andere Milieufaktor variiert wurde, fand ich, dass die Ausbildung dieses submersen, schleimigen Myzels in hohem Grade mit den Versuchsbedingungen wechselt. In einer optimalen Nährlösung entwickelt sich ein kräftiges Luftmyzel, und die Schleimbildung des submersen Myzels ist ziemlich unbedeutend. In Lösungen, in denen gewisse Faktoren suboptimal sind, findet indes eine sehr kräftige Schleimbildung statt. Da die hauptsächlich aus schleimigem, submersem Myzel bestehenden Kolonien verhältnismässig mehr wiegen als ebenso grosse Kolonien, welche mehr Luftmyzel gebildet haben, müssen die erhaltenen Trockengewichtsziffern in solchen Fällen als in gewissem Grade irreführend angesehen werden.

Wenn die Aneurinkonzentration suboptimal ist, bildet der Pilz ein solches schleimiges, submerses Myzel, aber wenig oder gar kein Luftmyzel. Die Myzeltrockengewichte in dem oben beschriebenen Versuch müssen deshalb mit grosser Vorsicht beurteilt werden. Aus der Kontrollreihe geht indes hervor, dass der Pilz ohne Aneurinzusatz nicht mehr als eine begrenzte Myzelmenge bilden kann. Ob der Pilz bei Anwesenheit von 10 mγ Aneurin absolut aneurinheterotroph ist oder allmählich unabhängig vom Aneurin als Milieufaktor weiterwachsen kann, muss hier unentschieden gelassen werden.

Wenn die Annahme richtig ist, dass die Pilze in der oben erwähnten *M. peronatus*-Gruppe in Lösungen mit suboptimalen Aneurinmengen zu einer gewissen Aneurinautotrophie übergehen können, dürfte ja ein Myzel, dessen Physiologie in dieser Weise verändert ist, auf aneurinfreiem Substrat gezüchtet werden können. Um diese Frage zu entscheiden, stellte ich folgenden Versuch an.

Versuch 15. Züchtung von Stammkulturmyzel und einem von Versuch 14 (Reihe mit 10 mγ Aneurin je Kolben) übertragenen Myzel von Marasmius peronatus A auf gewaschenem Agar + aneurinfreier Nährlösung und auf Malzagar.

Der Versuch wurde in derselben Weise ausgeführt wie Versuch 10 (S. 63). Als Substrat diente teils Nährlösung A, versetzt mit 1,5 % gewaschenem Agar, teils gewöhnlicher Malzagar.

Das radiäre Wachstum betrug nach 15 Tagen:
für das von Versuch 13 übertragene Myzel
auf dem aneurinfreien Agar 12 mm, auf dem Malzagar 28 mm;
für das Stammkulturmyzel
auf dem aneurinfreien Agar 19 mm, auf dem Malzagar 33 mm.
(Die Ziffern sind Mittelwerte von je 16 Messungen.)

Auf dem aneurinfreien Agar wurden sehr dünne Myzelien erhalten, auf dem Malzagar dagegen Myzeldecken von normaler Dichte.

Es wäre wünschenswert gewesen, dass die Untersuchung mit Züchtung der Myzelien in aneurinfreier Nährlösung fortgesetzt worden wäre. Indes gestatteten mir die Umstände leider nicht die Ausführung dieses Planes.

Ein Unterschied zwischen dem von Versuch 14 übertragenen Myzel und dem Stammkulturmyzel konnte in Versuch 15 nicht festgestellt werden. Ist deshalb die oben vorgeschlagene Erklärung der Wachstumskurve des Pilzes in Versuch 14 als unrichtig anzusehen?

Die Frage lässt sich meiner Ansicht nach auf Grund des vorliegenden Versuchsmaterials nicht endgültig entscheiden. Das bei Versuch 15 verwendete aneurinfreie Substrat muss sich in vielen Beziehungen von der Nährlösung unterscheiden, in der das Myzel während des späteren Teiles von Versuch 14 wuchs. Es kann nicht als ausgeschlossen betrachtet werden, dass Veränderungen, die während des Wachstums des Pilzes in der Kulturflüssigkeit eintreten, von wesentlicher Bedeutung bei einem eventuellen Übergang zu Aneurinbildung des Myzels sind. Dass die Wuchsstoffsynthese bei Pilzen von der Zusammensetzung der Nährlösung abhängig sein kann, ist bereits bekannt. So fanden Robbins & Kavanagh (1938), dass die Pyrimidinsynthese bei *Pythium Butleri* auf der Salzkonzentration der Nährlösung beruht: bei niedriger Salzkonzentration findet die Synthese statt, bei hoher nicht. Trotz des negativen Resultats von Versuch 15 habe ich es deshalb für berechtigt gehalten, als eine denkbare Erklärung der Wachstumskurven, die für gewisse *Marasmius*-Arten bei Versuchen mit suboptimalen Aneurinmengen erhalten wurden, eine allmählich einsetzende Aneurinsynthese anzunehmen.

c. *Die Aneurinheterotrophie der verschiedenen Arten.*

Schon die einleitenden Untersuchungen haben ergeben, dass die *Marasmius*-Arten synthetische Nährlösungen nur assimilieren können, wenn diese gewisse Wuchsstoffe enthalten. Wir können also mit Schopfer die Pilze als auxoheterotroph bezeichnen.

Folgende Arten vermögen eine synthetische Nährlösung zu assimilieren, wenn diese Aneurin enthält, und können somit aneurinheterotroph genannt werden: *M. alliaceus*, *M. chordalis*, *M. epiphyllus*, *M. foetidus*,

M. fulvobulbillosus, *M. graminum*, *M. perforans*, *M. peronatus*, *M. putillus*, *M. ramealis*, *M. rotula* und *M. scorodonius*.

M. androsaceus fordert einen Zusatz sowohl von Aneurin als von Biotin und ist also aneurin-biotin-heterotroph.

Eine nähere Analyse des Aneurinbedarfs der Pilze hatte folgendes Ergebnis:

Bei *M. fulvobulbillosus* kann die Aneurinkomponente Pyrimidin vollständig Aneurin ersetzen. Man muss annehmen, dass der Pilz selbst die Aneurinkomponente Thiazol bilden kann. Wird der Pilz längere Zeit in einer Lösung gezüchtet, die von Anfang an eine suboptimale Menge Aneurin enthält, so kommt das Wachstum allmählich zum Stillstand, vermutlich weil die Aneurinkomponente Pyrimidin verbraucht ist, nimmt aber dann nach einiger Zeit wieder seinen Fortgang. Um die Wachstumskurve des Pilzes in diesem Fall zu erklären, muss man annehmen, dass der Pilz unter gewissen Bedingungen dazu übergehen kann, auch die Aneurinkomponente Pyrimidin zu synthetisieren.

Auch *M. chordalis*, *M. epiphyllus* und *M. graminum* vermögen in Anwesenheit von Pyrimidin allein eine synthetische Nährlösung zu assimilieren, aber die Wachstumsgeschwindigkeit ist in diesem Fall geringer, als wenn die Lösung mit einer entsprechenden Menge Aneurin oder äquimolekularen Mengen Pyrimidin + Thiazol versetzt ist. Man muss voraussetzen, dass diese Pilze die Aneurinkomponente Thiazol bilden, allerdings in so geringer Menge, dass diese Komponente begrenzend auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze wirkt, wenn sie mit einem Überschuss von Pyrimidin gezüchtet werden. *M. graminum* scheint wie *M. fulvobulbillosus* nach längerer Züchtung in einer Lösung mit suboptimaler Aneurinkonzentration dazu übergehen zu können, die beiden Aneurinkomponenten zu bilden. Bei *M. chordalis* und *M. epiphyllus* ist dagegen das Unvermögen zur Bildung von Pyrimidin, nach dem vorliegenden Versuchsmaterial zu urteilen, absolut.

Bei den übrigen Arten, d. h. bei *M. alliaceus*, *M. androsaceus*, *M. foetidus*, *M. perforans*, *M. peronatus*, *M. putillus*, *M. ramealis*, *M. rotula* und *M. scorodonius* kann Aneurin durch äquimolekulare Mengen Pyrimidin und Thiazol ersetzt werden. Je für sich haben diese Stoffe keinen Einfluss auf die Pilze. Züchtung dieser Pilze unter Zusatz suboptimaler Aneurinmengen ergab, dass die Unfähigkeit, beide oder eine der beiden Aneurinkomponenten zu bilden, bei folgenden Arten absolut ist: *M. androsaceus*, *M. foetidus*, *M. perforans*, *M. putillus*, *M. rotula* und *M. scorodonius*. *M. peronatus* und *M. ramealis* verhielten sich wie *M. fulvobulbillosus* und *M. graminum*: das Wachstum hörte auf, nachdem das Aneurin verbraucht war, kam aber dann wieder in Gang. Auch diese Arten scheinen

also unter gewissen Umständen zu einer gewissen Aneurinautotrophie übergehen zu können. Für *M. alliaceus* ergaben die Versuche mit suboptimalen Aneurinmengen keine eindeutigen Resultate.

Von besonderem Interesse sind die Arten, deren Wachstum in einer Lösung mit suboptimaler Aneurinkonzentration nach einiger Zeit infolge von Aneurinmangel aufhört, dann aber wieder weitergeht. Diese Pilze erinnern an die von Fries (1938) studierte Polyporazee *Daedalea unicolor*. Wir haben es hier mit einer Gruppe von Arten zu tun, die zwischen den absolut aneurinheterotrophen und den aneurinautotrophen Organismen stehen. Das vorliegende Versuchsmaterial gibt keinen endgültigen Aufschluss über die Art der Aneurinheterotrophie dieser Pilze. Indes scheint es mir am natürlichsten, bis auf weiteres anzunehmen, dass sie zu einer gewissen Aneurinbildung übergehen können, wenn sie in einer Nährlösung mit von Anfang an suboptimaler Aneurinkonzentration gezüchtet werden und Gelegenheit haben, sich sukzessiv an ein aneurinfreies Substrat anzupassen. Meine Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Zwischentypen unter den höheren Pilzen häufiger sind, als man bisher geglaubt hat.

3. Biotin als wachstumsbegrenzender Faktor bei *Marasmius androsaceus*.

Die Frage, ob Biotin auf biotinheterotrophe Pilze in dem Sinne quantitativ wirkt, dass eine gewisse Menge dieses Stoffes bloss die Bildung einer bestimmten Myzelmenge gestattet, ist von Fries (1938) behandelt worden. Er untersuchte die Wirkung suboptimaler Mengen Biotin auf das Wachstum von *Nematospora gossypii*. Diese Untersuchungen ergaben jedoch keine sicheren Resultate. Je kleiner die zugesetzte Biotinmenge war, um so langsamer wuchs der Pilz, aber es konnte in keinem Fall nachgewiesen werden, dass das Wachstum aufhörte, weil das Biotin verbraucht war.[1]

In *Marasmius androsaceus* habe ich selbst ein Objekt gefunden, das, um eine synthetische Nährlösung assimilieren zu können, einen Zusatz von Biotin und Aneurin erfordert (siehe Versuch 3 und 5). Ich beschloss, den Biotinbedarf dieses Pilzes näher zu untersuchen, um wenn möglich zu ermitteln, ob das Biotin in diesem Fall quantitativ wirkte.[2]

[1] Schopfer & Blumer (1943) haben kürzlich den Einfluss von Biotin auf *Trichophyton album* untersucht. Die Verfasser behaupten in der Zusammenfassung ihrer Arbeit (l. c., S. 453), dass Biotin quantitativ auf diesen Pilz wirkt. Diese Behauptung wird nicht durch die Versuchsresultate gestützt (vgl. l. c., S. 425, 447).

[2] Eine vorläufige Mitteilung über diese Untersuchungen ist bereits veröffentlicht worden (Lindeberg 1941).

Tabelle 27.

Der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Biotin auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus* B (Versuch 16).

Versuchszeit in Tagen	1 mγ Biotin je Kolben		10 mγ Biotin je Kolben		50 mγ Biotin je Kolben		100 mγ Biotin je Kolben	
	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH 5,5 ↓
6	0,2	5,5	0,3	5,5	0,3	5,5	—	—
10	—	—	—	—	—	—	1,5	5,3
12	1,6	5,3	2,6	5,1	2,4	5,1	—	—
18	3,6	4,9	8,6	4,6	7,2	4,6	—	—
20	—	—	—	—	—	—	8,5	4,6
24	4,3	4,7	14,6	4,3	16,2	4,3	—	—
30	3,8	4,7	17,6	4,2	19,8	4,2	19,5	4,2
36	4,8	4,5	21,2	4,1	25,4	4,1	—	—
40	—	—	—	—	—	—	26,4	4,0
42	4,8	4,4	28,0	3,9	29,8	3,9	—	—
60	6,3	4,3	41,5	3,6	63,3	3,4	57,8	3,5
75	7,5	4,3	53,3	3,4	80,5	3,1	79,0	3,1
90	6,6	4,2	64,1	3,1	74,5	3,0	71,3	3,0

Kontrolle: < 0,1 mg nach 12 Tagen.
< 0,1 » » 30 »
< 0,1 » » 75 »

a. *Versuche.*

Bei den früheren Untersuchungen über den Effekt des Biotins auf *M. androsaceus* war dieser Stoff in den Konzentrationen 10 und 50 mγ je Kolben zugesetzt worden. Um die optimale Biotinkonzentration für den Pilz festzustellen und mir ein Urteil darüber zu bilden, welche Biotinkonzentrationen bei einem Versuch zu wählen seien, welcher bezweckte, die eventuelle quantitative Wirkung suboptimaler Biotinmengen auf diesen Pilz nachzuweisen, nahm ich einen Versuch vor, bei dem das Biotin in verschiedenen Reihen in den Mengen von 1, 10, 50 und 100 mγ je Kolben zugesetzt wurde.

Versuch 16. Der Einfluss verschiedener Mengen Biotin auf das Wachstum von Marasmius androsaceus B (Tab. 27, Fig. 9).

Nährlösung A mit 50 γ Aneurin je Liter. 5 Reihen nach Tab. 27. 6 Parallelkolben.

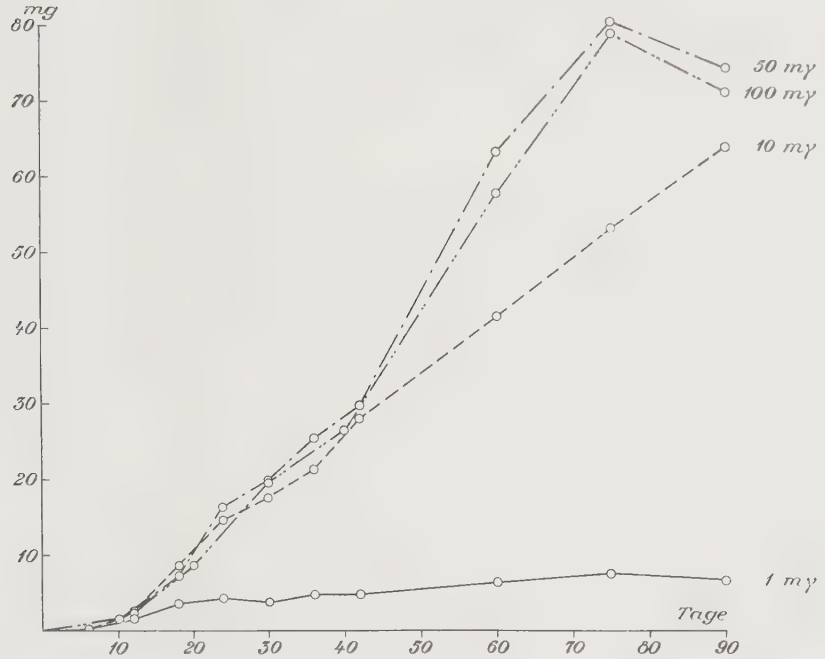

Fig. 9. Der Einfluss verschiedener Biotinmengen auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus* B (Versuch 16).

In der Kontrollreihe war kein Wachstum zu beobachten.

Mit steigender Biotinkonzentration nahm die Wachstumsgeschwindigkeit bis zu einer gewissen Grenze zu. In der Reihe mit 1 mγ Biotin je Kolben vollzog sich das Wachstum sehr langsam und kam nach 75 Tagen zum Stillstand, nachdem ungefähr 7 mg Myzel gebildet worden waren. Ob dies darauf beruhte, dass das Biotin verbraucht worden war, liess sich bei diesem Versuch nicht entscheiden. Während der ersten 40 Tage des Versuchs war die Wirkung des Biotins schon bei einer Biotinkonzentration von 10 mγ je Kolben (20 ccm) maximal. Danach erfolgte das Wachstum indes etwas rascher in den Reihen mit 50 und 100 mγ Biotin je Kolben, und nur in diesen wurde die unter den herrschenden Versuchsbedingungen grösstmögliche Myzelmenge, ca. 80 mg je Kolben, erhalten, während das Wachstum in der Reihe mit 10 mγ Biotin je Kolben, solange der Versuch dauerte, nicht aufhörte.

Kögl & Fries (1937) fanden, dass Biotin maximale Wirkung auf *Nematospora gossypii* bei einer Konzentration von 10 mγ je 25 ccm Nährlösung hatte, d. h. bei einer Verdünnung von 1 : 2 500 000 000. Nilsson, Bjälfve & Burström (1939) erzielten maximale Biotinwirkung auf *Bact.*

radicicola bei einer Biotinkonzentration von 0,5 mγ je ccm Nährlösung, d. h. bei einer Verdünnung von 1 : 2 000 000 000. Es ist von Interesse festzustellen, dass die maximale Wirkung des Biotins auf *Marasmius androsaceus* in Versuch 16 bei ungefähr derselben Verdünnung erreicht wurde (1 : 2 000 000 000).

Bei Zeitversuchen mit suboptimalen Biotinmengen, durch welche untersucht werden soll, ob die Wirkung des Biotins auf *M. androsaceus* quantitativ ist, scheint es nach den Versuchsergebnissen zweckmässig zu sein, mit Biotinkonzentrationen von ungefähr 1 mγ je 20 ccm Nährlösung zu arbeiten. Deshalb wurde in Versuch 17 die Wachstumskurve für *M. androsaceus* bei Anwesenheit von 1 bzw. 2 mγ Biotin je Kolben studiert.

Versuch 17. Der Einfluss von 1 und 2 mγ Biotin auf das Wachstum von Marasmius androsaceus B (Tab. 28, Fig. 10).

Nährlösung A mit 50 γ Aneurin je Liter. 3 Reihen nach Tab. 28. 6 Parallelkolben.

Auch bei diesem Versuch konnte der Pilz die Nährlösung nicht ohne Zusatz von Biotin assimilieren. Das Wachstum in den beiden Reihen mit Biotin war so eigentümlich, dass ich es für angebracht halte, sämtliche in diesen Reihen erhaltenen Primärwerte des Trockengewichts mitzuteilen. Aus Tab. 28 geht hervor, dass die Wachstumsgeschwindigkeit in diesen Reihen anfangs der zugesetzten Biotinmenge proportional war. Nach längerer Versuchszeit als 40 Tagen wurden indes Werte erhalten, welche zeigten, dass sich der Pilz in den beiden Reihen in prinzipiell verschiedener Weise verhielt. In der Reihe mit 2 mγ Biotin je Kolben ging das Wachstum normal weiter, bis das Myzeltrockengewicht nach 110 Tagen ca. 50 mg betrug. In der Reihe mit 1 mγ Biotin je Kolben dagegen zeigten die für die Myzeltrockengewichte erhaltenen Werte sowohl absolut als relativ eine immer grössere Streuung um die betreffenden Mittelwerte. In dieser Reihe scheint ein Teil der Myzelien schon nach ungefähr einmonatiger

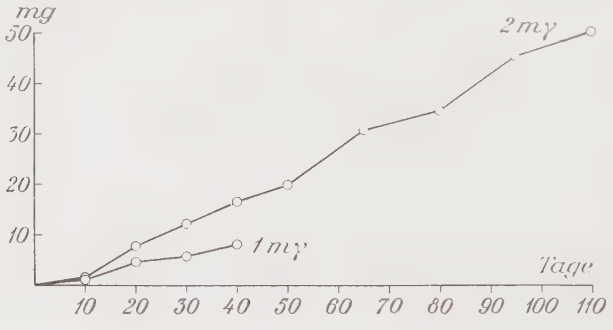

Fig. 10. Der Einfluss von 1 und 2 mγ Biotin auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus* B (Versuch 17).

Tabelle 28.

Der Einfluss von 1 und 2 mγ Biotin auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus* B (Versuch 17).

a) Kontrolle: 0,2 mg nach 50 Tagen.
b) 1 mγ Biotin je Kolben.

Versuchszeit in Tagen		10	20	30	40	50	65	80	95	110
Myzeltrockengewicht in mg	Primärwerte	1,5	5,5	6,8	8,9	13,6	19,9	26,0	31,9	34,0
		1,4	5,2	6,0	8,6	13,2	17,3	21,5	29,8	28,5
		1,2	4,5	5,7	8,2	11,7	16,4	17,5	28,3	23,8
		1,1	4,4	5,5	8,2	8,9	16,3	13,5	16,0	15,4
		1,0	4,2	5,5	8,2	8,6	12,8	13,2	12,7	9,7
		0,7	4,1	5,0	6,2	6,7	9,4	9,5	10,2	6,7
	Mittelwerte	1,2	4,7	5,8	8,1	(10,5)	(15,4)	(16,9)	(21,5)	(19,7)
pH : 5,5 →		5,2	4,7	4,5	4,2	(4,0)	(3,9)	(3,9)	(3,8)	(3,8)

c) 2 mγ Biotin je Kolben.

Versuchszeit in Tagen		10	20	30	40	50	65	80	95	110
Myzeltrockengewicht in mg	Primärwerte	2,2	8,9	14,4	20,1	24,6	36,9	39,4	52,2	54,8
		2,2	8,2	13,0	17,9	20,7	31,5	36,0	45,8	54,5
		1,7	8,0	12,0	17,1	20,1	30,8	35,8	44,8	49,5
		1,4	7,5	11,4	16,3	19,2	29,8	34,9	44,7	49,0
		1,2	7,2	11,4	14,3	18,2	29,1	34,7	44,7	46,8
		1,1	7,0	10,7	13,6	16,8	26,0	26,8	39,3	46,5
	Mittelwerte	1,6	7,8	12,2	16,6	19,9	30,7	34,6	45,3	50,2
pH : 5,5 →		5,2	4,5	4,2	4,0	3,8	3,6	3,6	3,3	3,2

Versuchsdauer das Wachstum eingestellt zu haben, während andere mit wechselnder Geschwindigkeit oder möglicherweise nach verschieden langen Pausen ihr Wachstum fortsetzten. Tatsächlich konnten auch keine eigentlichen Mittelwerte in dieser Reihe nach längerer Versuchszeit als 40 Tagen berechnet werden. Die Biotinkonzentration 1 mγ je Kolben (1 : 20 000 000 000) scheint also eine kritische Konzentration für den untersuchten Stamm von *M. androsaceus* zu sein.

Um zu ermitteln, wie der Pilz auf noch kleinere Biotinmengen reagierte, wurde ein Versuch angestellt, bei dem 0,2, 0,5 und 2 mγ Biotin je Kolben zugesetzt wurden.

Versuch 18. Der Einfluss von 0,2, 0,5 und 2 mγ Biotin auf das Wachstum von Marasmius androsaceus B (Tab. 29, Fig. 11).

Nährlösung A mit 50 γ Aneurin je Liter. 4 Reihen nach Tab. 29. 6 Parallelkolben.

Die Unfähigkeit des Pilzes, ohne Biotinzusatz zu wachsen, bestätigte sich. In den Reihen mit 0,2 und 0,5 mγ Biotin je Kolben wuchs der Pilz äusserst langsam. Nach ungefähr einem Monat hörte das Wachstum bei einem Myzeltrockengewicht von ca. 1 bzw. 2 mg auf. Nach 54 Tagen wurden in 6 Kolben aus jeder dieser Reihen 10 mγ Biotin zugesetzt. Dies hatte zur Folge, dass in diesen Kolben sofort ein rasches Wachstum begann. Hieraus geht hervor, dass das Wachstum in diesen Reihen infolge von Biotinmangel zum Stillstand gekommen war. Das Wachstum in der Reihe mit 2 mγ Biotin stimmte gut mit dem überein, welches in der entsprechenden Reihe von Versuch 17 erhalten worden war. Noch nach 3 Monaten, als das Myzeltrockengewicht ca. 40 mg betrug, war keine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit zu bemerken.

In den bisher beschriebenen Versuchen hatte das Biotin also in verschiedenen Konzentrationsgebieten verschiedene Wirkung auf den benutzten Stamm von *M. androsaceus*. Bei sehr schwachen Biotinkonzentrationen, 0,2–0,5 mγ je 20 ccm Nährlösung, war die Wirkung des Biotins von quantitativer Natur. Das Biotin wurde während des Wachstums verbraucht, und die gebildete Myzelmenge war der zugesetzten Biotinmenge proportional. Bei etwas stärkeren Biotinkonzentrationen, 2 mγ oder mehr je 20 ccm Nährlösung, herrschte keine solche Proportionalität zwischen schliesslicher Myzelmenge und zugesetzter Biotinmenge. Das Wachstum schien hier weitergehen zu können, bis es durch irgendeinen anderen Faktor gehemmt wurde. Zwischen diesen beiden Konzentrationsgebieten, d. h. bei einem Zusatz von ungefähr 1 mγ Biotin je 20 ccm Nährlösung, lag ein „kritisches" Gebiet, welches dadurch gekennzeichnet war, dass das Myzel bald auf die eine, bald auf die andere Weise reagierte. Die abnorme Streuung der Werte in der Reihe mit 1 mγ Biotin in Versuch 17 dürfte darauf beruhen, dass die bei dem Versuch verwendeten Impfstücke nicht absolut gleichwertig waren. Eine gewisse Variation im Alter des Myzels und in der Grösse der Stücke ist nämlich bei der hier angewandten Impfmethodik nicht ganz zu vermeiden. In einem solchen Grenzfall, wie er hier vorliegt, tritt also die Unvollkommenheit der Methodik besonders scharf hervor.

Um zu ermitteln, wie das Biotin wirkt, wenn es in einer Lösung gerade in hinreichender Menge vorhanden ist, damit das Wachstum unbegrenzt weitergehen kann, ist es von Wichtigkeit, die Veränderung der Biotinkonzentration durch das Wachstum des Pilzes in einer solchen Lösung zu untersuchen.

Tabelle 29.

Der Einfluss von 0,2, 0,5 und 2 mγ Biotin auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus* B (Versuch 18).

Versuchszeit in Tagen	0,2 mγ Biotin je Kolben		0,5 mγ Biotin je Kolben		2 mγ Biotin je Kolben	
	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓
15	0,5	5,4	1,3	5,3	2,7	5,0
25	0,8	5,3	2,1	5,0	10,1	4,5
35	0,9	5,2	2,1	4,8	13,5	4,2
50	0,8	5,1	2,1	4,8	20,7	4,0
66	1,0	5,0	2,0	4,8	—	—
75	0,9	5,0	2,0	4,8	25,8	3,8
88	0,9	5,0	1,7	4,8	39,5	3,5
54 + 34[1]	35,3	3,8	35,0	3,8	—	—

Kontrolle: 0,2 mg nach 35 Tagen.
0,1 » » 88 »

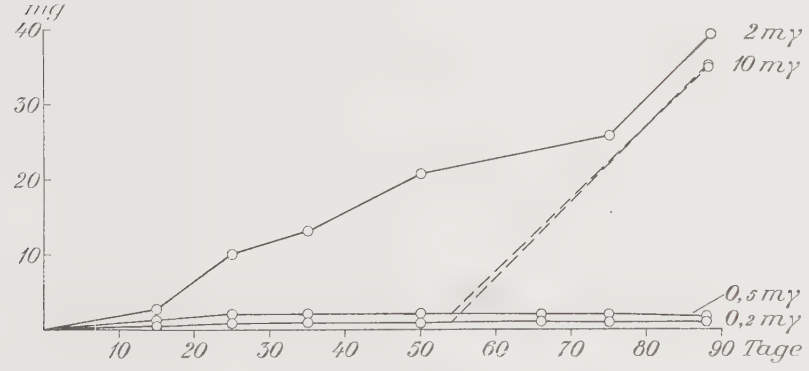

Fig. 11. Der Einfluss von 0,2, 0,5 und 2 mγ Biotin auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus* B; ——: Wachstum nach Zusatz von 10 mγ Biotin je Kolben (Versuch 18).

Die Tatsache, dass das Biotin innerhalb eines gewissen Konzentrationsgebietes quantitative Wirkung auf die Myzelbildung bei *M. androsaceus* hat, muss sich zu einer ungefähren Bestimmung der Biotinmenge in Lö-

[1] Nach so vielen Tagen, wie die erste Zahl angibt, wurden jedem dieser Kolben 10 mγ Biotin zugesetzt. Nach weiteren so vielen Tagen, wie die zweite Zahl angibt, wurden die Kolben abgeerntet.

sungen benutzen lassen, wenigstens wenn diese eine Zusammensetzung haben, die nicht allzusehr von der der hier verwendeten Nährlösung abweicht. Dementsprechend führte ich einige Versuche aus, um festzustellen, in welcher Richtung *M. androsaceus* die Biotinkonzentration der Nährlösung veränderte, wenn diese bei Beginn des Versuchs in dem Gebiet lag, in dem kein quantitativer Effekt nachweisbar war.

Für diese Untersuchungen wurde folgender Plan aufgestellt: Zuerst sollte ein Versuch vorgenommen werden, welcher grundsätzlich mit Versuch 18 übereinstimmte. Dieser sollte ausser der Kontrollreihe a eine Reihe b mit quantitativ wirkender Biotinmenge, nämlich 0,5 mγ je Kolben, und eine Reihe c mit einer achtmal grösseren Menge dieses Stoffes, d. h. 4 mγ je Kolben, umfassen. Wenn die Myzelmenge in der letzteren Reihe mehr als achtmal grösser geworden war als die, welche maximal in Reihe b gebildet werden konnte, musste ja das Biotin, wenn es auch in diesem Fall quantitativ wirkte, verbraucht worden sein. In einem folgenden Versuch sollte der Biotingehalt der Kulturflüssigkeit in Reihe c folgendermassen untersucht werden: *M. androsaceus* sollte in einer Nährlösung von derselben Zusammensetzung wie im vorigen Versuch gezüchtet werden, die zu einem Achtel ihres Volumens mit Kulturflüssigkeit von Reihe c versetzt war, entnommen, nachdem die Myzelproduktion in dieser Reihe mindestens achtmal grösser geworden war als in Reihe b. Durch Vergleich der Myzelproduktion in dieser Lösung mit der in einer gleichzeitig in Gang gesetzten Reihe mit 0,5 mγ reinem Biotin je Kolben müsste die Frage der Veränderung der Biotinkonzentration entschieden werden können.

Versuch 19. Der Einfluss von 0,5, 4 und 6 mγ Biotin auf das Wachstum von Marasmius androsaceus B (Tab. 30, Fig. 12).

Nährlösung A mit 50 γ Aneurin je Liter. 4 Reihen nach Tab. 30.

6 Parallelkolben.

In der Reihe mit 0,5 mγ Biotin je Kolben betrug das Myzeltrockengewicht nach 34 Tagen 1,4 mg, und ein weiteres Wachstum war danach nicht zu konstatieren. Als nach 58 Tagen überschüssiges Biotin zugesetzt wurde, begann das Wachstum indes wieder. In den Reihen mit 4 und 6 mγ Biotin je Kolben ging das Wachstum während der ganzen Dauer des Versuchs unbeschränkt weiter, und nach 80 Tagen hatten sich in diesen Reihen 61 bzw. 65 mg Myzel gebildet. Im ersten Teil des Versuchs, ungefähr bis zum 34. Tage, war die Wachstumsgeschwindigkeit in der Reihe mit 6 mγ Biotin je Kolben grösser als in der mit 4 mγ Biotin je Kolben. Im späteren Teil des Versuchs wuchs der Pilz dagegen in diesen beiden Reihen ungefähr gleich rasch.

Tabelle 30.

Der Einfluss von 0,5, 4 und 6 mγ Biotin auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus* B (Versuch 19).

Versuchszeit in Tagen	0,5 mγ Biotin je Kolben		4 mγ Biotin je Kolben		6 mγ Biotin je Kolben	
	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓
15	0,6	5,2	5,3	4,7	6,7	4,6
25	1,1	5,0	12,8	4,2	16,0	4,1
34	1,4	4,9	18,3	4,0	27,3	3,7
48	1,4	4,8	27,7	3,7	36,0	3,6
68	—	—	44,2	3,5	56,3	3,2
80	1,4	4,7	61,0	3,2	64,8	3,1
58 + 22[1]	9,7	4,4	—	—	—	—

Kontrolle: 0,2 mg nach 34 Tagen.
0,2 » » 80 »

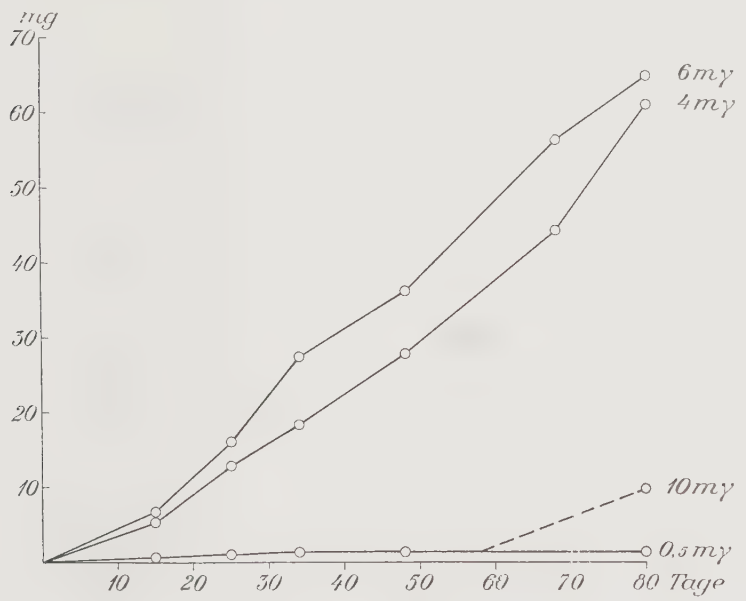

Fig. 12. Der Einfluss von 0,5, 4 und 6 mγ Biotin auf das Wachstum von *Marasmius androsaceus* B; ----- Wachstum nach Zusatz von 10 mγ Biotin je Kolben (Versuch 19).

[1] Siehe Fussnote S. 93.

Um die Veränderung der Biotinkonzentration in der Reihe mit 4 mγ Biotin je Kolben zu untersuchen, wählte ich eine Anzahl Kolben nach 34-tägiger Versuchszeit aus. Das Myzeltrockengewicht betrug damals in dieser Reihe 18,3 mg, d. h. es war 13-mal mehr Myzel gebildet worden, als maximal in der Reihe mit 0,5 mγ Biotin je Kolben gebildet wurde. Über die Versuchsmethodik wird näher bei Versuch 20 berichtet.

Versuch 20. Untersuchung über die Biotinkonzentration in von Versuch 19 stammender Kulturflüssigkeit, welche anfangs 4 mγ Biotin je 20 ccm enthielt, und in der Marasmius androsaceus B 34 Tage gezüchtet worden war (Tab. 31).

Die Kulturflüssigkeit von 6 Kolben aus der Reihe mit 4 mγ Biotin je Kolben in Versuch 19 wurde zusammengegossen. Die Myzelien wurden sukzessiv mit kleinen Mengen destilliertem Wasser gewaschen und das Waschwasser der Kulturflüssigkeit zugesetzt, bis das gesamte Flüssigkeitsvolumen 120 ccm betrug. 2,5 ccm dieser Flüssigkeit entsprachen bei Beginn von Versuch 19 0,5 mγ Biotin. Diese Kulturflüssigkeit wurde zur Bereitung von Reihe c verwendet (siehe unten).

Um zu untersuchen, ob das Myzel Biotin enthielt, welches eventuell erst nach Tötung des Myzels in die Flüssigkeit übergehen konnte, wurden gleichzeitig 6 Kolben derselben Reihe von Versuch 19 autoklaviert, worauf die Kulturflüssigkeit entnommen wurde und Waschung in der oben beschriebenen Weise stattfand. Diese Kulturflüssigkeit wurde zur Bereitung von Reihe d verwendet (siehe unten).

Tabelle 31.

Untersuchung der Biotinkonzentration in von Versuch 19 stammender Kulturflüssigkeit, welche anfangs 4 mγ Biotin je 20 ccm enthielt, und in der *Marasmius androsaceus* B 34 Tage gezüchtet war (Versuch 20).

Versuchszeit in Tagen	0,5 mγ Biotin		Kulturflüssigkeit entsprechend 0,5 mγ Biotin		Mit Myzel autoklavierte Kulturflüssigkeit entsprechend 0,5 mγ Biotin	
	Trockengewicht in mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 4,9 ↓	Trockengewicht in mg	pH: 4,9 ↓
15	0,5	5,3	0,3	4,9	0,3	4,9
35	1,4	5,2	0,3	4,9	0,3	4,9
55	1,3	4,9	0,3	4,9	0,3	4,8
80	1,4	4,8	0,3	4,8	0,3	4,8
42 + 38[1]	—	—	27,7	3,8	28,6	3,8

Kontrolle: 0,2 mg nach 35 Tagen.
0,2 » » 80 »

[1] Siehe Fussnote S. 93.

Nährlösung A mit 50 γ Aneurin je Liter. Diese Lösung wurde so zubereitet, dass der für 1 l Wasser bestimmten Salzmenge zuerst 875 ccm Wasser zugesetzt wurden. In den Reihen a und b wurde die restierende Wassermenge zugesetzt, in den Reihen c und d statt dessen Kulturflüssigkeit von Versuch 19.

Reihen: a) Kontrolle (pH 5,5).
b) 0,5 mγ Biotin je Kolben (pH 5,5).
c) 2,5 ccm Kulturflüssigkeit von Versuch 19, Reihe c, je Kolben (pH 4,9).
d) 2,5 ccm mit Myzel autoklavierte Kulturflüssigkeit von Versuch 19, Reihe c, je Kolben (pH 4,9).

6 Parallelkolben.

Wie in Versuch 19 wurden hier in den Kolben mit 0,5 mγ Biotin maximal 1,4 mg Myzel gebildet. In den Kolben, denen Kulturflüssigkeit entsprechend 0,5 mγ Biotin zugesetzt worden war, konnte dagegen kein Wachstum mit Sicherheit beobachtet werden. Als in diesen Reihen nach 42 Tagen überschüssiges Biotin zugesetzt wurde, begann das Myzel indes sofort mit normaler Geschwindigkeit zu wachsen.

Nachdem *M. androsaceus* 34 Tage bei Anwesenheit von 4 mγ Biotin je Kolben gezüchtet worden war, enthielt die Nährlösung also keine nachweisbaren Mengen Biotin. Dass sich in der untersuchten Lösung keine hemmenden Stoffe gebildet hatten, die das Hervortreten eines eventuellen Biotineffekts hinderten, geht daraus hervor, dass ein Zusatz von überschüssigem Biotin sofort Wachstum auslöste. Auch nachdem das Myzel zusammen mit der Kulturflüssigkeit autoklaviert worden war, konnte in der letzteren kein Biotin nachgewiesen werden.

Als Komplement zu Versuch 20 wurde Versuch 21 ausgeführt. Bei diesem wurde der Biotingehalt in Kulturflüssigkeit von Versuch 19, Reihe c, untersucht, die nach 75 Tagen entnommen wurde, als das Myzeltrockengewicht dieser Reihe 54,0 mg betrug. Die Kulturflüssigkeit wurde diesmal aseptisch aus den betreffenden Kolben in Versuch 19 in die Versuchskolben von Versuch 21 überführt, welch letztere die sterilisierte Grundlösung enthielten. Im Unterschied zu Versuch 20 wurde also die hier untersuchte Kulturflüssigkeit nicht autoklaviert.

Versuch 21. Untersuchung der Biotinkonzentration in von Versuch 19 stammender Kulturflüssigkeit, welche anfangs 4 mγ Biotin je 20 ccm enthielt, und in der Marasmius androsaceus B 75 Tage gezüchtet worden war (Tab. 32).

Aus der Nährlösung A mit Aneurin wurde eine doppelt konzentrierte Lösung (Grundlösung) bereitet. Diese wurde in Portionen von 10 ccm auf die Versuchskolben verteilt. In der Hälfte der Kolben wurde die Lösung mit 2 mγ Biotin je Kolben versetzt. Hierauf wurden sämtliche Kolben autoklaviert. Durch aseptischen Zusatz von sterilem Wasser bzw. aseptisch entnommener Kulturflüssigkeit von Versuch 19, Reihe c, wurden endlich 4 Reihen nach Tabelle 32 bereitet.

Jedem Kolben in Versuch 19 waren nach 60-tägiger Versuchszeit 10 ccm H_2O zugesetzt worden. Nach 75 Tagen betrug das Flüssigkeitsvolumen in den noch vorhandenen Kolben jedoch etwas weniger als 20 ccm. Eine Justierung des Flüssigkeitsvolumens fand indes nicht statt. 10 ccm Kulturflüssigkeit entsprachen deshalb etwas mehr als der Hälfte der ursprünglich zugesetzten Biotinmenge von 4 mγ.

Tabelle 32.

Untersuchung der Biotinkonzentration in von Versuch 19 stammender Kulturflüssigkeit, welche anfangs 4 mγ Biotin je 20 ccm enthielt, und in der *Marasmius androsaceus* B 75 Tage gezüchtet worden war (Versuch 21).

Versuchszeit 25 Tage.

Zusammensetzung der Lösung je Kolben	Anf.-pH	End-pH	Ernte von *M. androsaceus* mg
10 ccm Grundlösung + 10 ccm H_2O	5,5	5,1	0,2 ± 0,0
10 » » + 10 ccm Kulturflüssigkeit . . .	4,3	4,1	0,3 ± 0,0
10 » » + 2 mγ Biotin + 10 ccm H_2O . .	5,5	4,4	5,9 ± 0,6
10 » » + 2 mγ Biotin + 10 ccm Kulturflüssigkeit	4,3	3,9	10,8 ± 1,1

Das Versuchsresultat bestätigt das Ergebnis von Versuch 20. Biotin konnte nicht in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen werden, welche anfangs 4 mγ davon je 20 ccm enthielt, und in der *M. androsaceus* 75 Tage gezüchtet worden war. In Anwesenheit von Biotin hatte die Kulturflüssigkeit indes günstigen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes. Dies kann darauf beruhen, dass das pH der Lösung durch die Kulturflüssigkeit von 5,5 auf 4,3 gesenkt wurde (vgl. S. 111). Die veränderte Nährsalzkonzentration oder von dem Pilz selbst gebildete Wuchsstoffe können indes auch stimulierend auf das Wachstum gewirkt haben.

Systematische Untersuchungen über die Abhängigkeit der Biotinheterotrophie von der übrigen Zusammensetzung der Nährlösung wurden nicht vorgenommen. Hier sei schliesslich nur in aller Kürze ein Versuch erwähnt, welcher ermitteln sollte, ob der Pilz auch in Anwesenheit der Metalle Ca und Mn einen Zusatz von Biotin erforderte. Als Grundlösung diente Nährlösung A mit 50 γ Aneurin je Liter. In drei verschiedenen Reihen wurde diese mit 100 mg $CaSO_4.2H_2O$, 100 mg $CaSO_4.2H_2O$ + 5 mg $MnSO_4.4H_2O$ und 10 ccm Aschenlösung (vgl. Versuch 23) je Liter versetzt. Ausserdem wurden eine Versuchsreihe mit 0,5 γ Biotin je Liter und eine Kontrollreihe (kein Zusatz) ausgeführt. Das Myzeltrockengewicht betrug in der Reihe mit Biotin nach 25 Tagen 12 mg und nach 50 Tagen 24 mg. In den übrigen Reihen fand kein Wachstum statt (Myzeltrockengewicht

nach 75 Tagen 0,2–0,3 mg). Der Versuch zeigte also, dass die Metalle Ca und Mn die Biotinheterotrophie des Pilzes jedenfalls nicht wesentlich beeinflussen.

Die Resultate der Untersuchungen über den Einfluss von Biotin auf den verwendeten Stamm von *M. androsaceus* lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

Der Pilz konnte eine synthetische Nährlösung nicht assimilieren, wenn diese nicht — ausser Aneurin — Biotin enthielt.

Bei sehr schwachen Biotinkonzentrationen, 0,2–0,5 mγ je 20 ccm Nährlösung, war die Wirkung des Biotins quantitativer Natur. Das Biotin wurde während des Wachstums verbraucht, und die gebildete Myzelmenge war der zugesetzten Biotinmenge proportional.

Bei einer Biotinkonzentration von ca. 2 mγ Biotin je 20 ccm Nährlösung war dagegen anscheinend unbegrenztes Wachstum möglich. Wurde die Biotinkonzentration weiterhin gesteigert, so stieg die Wachstumsgeschwindigkeit, bis maximaler Effekt bei einer Konzentration von ca. 10 mγ Biotin je 20 ccm Nährlösung erreicht wurde. Auch wenn die Anfangskonzentration des Biotins ausreichend war, um unbegrenztes Wachstum zu ermöglichen, wurde das zugesetzte Biotin vom Myzel in einem relativ frühen Stadium vollständig aus der Lösung aufgenommen.

Über den Myzel-Biotin-Quotienten in den Fällen, wo das Biotin quantitative Wirkung auf die Myzelbildung hatte, sei folgendes bemerkt:

Die Resultate der Versuche 16 und 17 können so gedeutet werden, dass 1 mγ Biotin für die Bildung einer Myzelmenge von ca. 7 mg ausreichte, d. h. der Myzel-Biotin-Quotient würde $7 \cdot 10^6$ betragen. In Versuch 18 wurden mit 0,5 mγ Biotin 2,1 mg und in Versuch 19 mit derselben Biotinmenge 1,4 mg Myzel erhalten, was nach Korrektion unter Abzug der Kontrollwerte (0,2 mg) einem Myzel-Biotin-Quotienten von $1{,}9 \cdot 10^6$ bzw. $1{,}2 \cdot 10^6$ entspricht.

Was die Ursache dieser sukzessiven Abnahme der Effektivität des Biotins gegenüber dem Pilz war, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Die genannten Versuche wurden mit erheblichen zeitlichen Zwischenräumen ausgeführt (Versuch 16 begann im November 1938, Versuch 18 im Mai 1939 und Versuch 19 im Juni 1941), und es ist möglich, dass sich der Biotinbedarf des Pilzes während dieser Zeit geändert hat. Auch ist es ja nicht ausgeschlossen, dass das Biotin, welches in Wasserlösung (unter möglichst aseptischen Verhältnissen zubereitet) aufbewahrt wurde, eine gewisse

Veränderung erfahren hat. Diese mangelnde Konstanz der Effektivität des Biotins beeinflusst indes die hier mitgeteilten Resultate nicht wesentlich.

b. *Besprechung der Versuchsergebnisse.*

Die Wirkungsweise des Biotins auf *Marasmius androsaceus* ist nach den hier mitgeteilten Versuchsergebnissen von der Anfangskonzentration des Wuchsstoffs im Substrat abhängig. Dies erscheint vielleicht seltsam, lässt sich aber meiner Ansicht nach durch folgende Annahme erklären:

Das Biotin wirkt unter allen Umständen quantitativ, d. h. eine gewisse Biotinmenge reicht bloss für die Bildung einer bestimmten Menge Myzel aus. Bei Biotinkonzentrationen, die unter einem gewissen Schwellenwert liegen — in Versuch 18 1 mγ je 20 ccm Nährlösung — zeigt sich diese quantitative Wirkung ganz deutlich. Bei Biotinkonzentrationen über dem genannten Schwellenwert wird dieselbe dadurch verschleiert, dass der Pilz selbst allmählich Biotin zu synthetisieren beginnt. Das Biotin, welches sich anfangs in der Nährlösung befindet, wird vollständig von dem wachsenden Myzel aufgenommen. Die Biotinsynthese, welche allmählich in Gang kommt, wenn die Biotinkonzentration des Mediums über dem Schwellenwert liegt, ist nicht stärker, als dass das Biotin, je nachdem es gebildet wird, in den Zellen gebunden wird (vgl. S. 83). Die Biotinkonzentration der Nährlösung wird deshalb durch diese Synthese nicht erhöht.

Die Impfung erfolgte bei diesen Versuchen von Malzagarplatten. Die Frage, ob eine Biotinsynthese in Myzel von *M. androsaceus* stattfindet, wenn dieses auf Malzagar gezüchtet wird, welcher ja verhältnismässig grosse Mengen Biotin enthält, ist in diesem Zusammenhang von grossem Interesse.

Wir wollen zunächst annehmen, dass eine Biotinsynthese stattfindet. Die Abhängigkeit des Pilzes vom Biotin in den geschilderten Versuchen muss dann folgendermassen gedeutet werden: Das Impfverfahren selbst hat eine solche Wirkung auf das Myzel, dass dessen Fähigkeit zur Synthetisierung von Biotin verlorengeht. Nur wenn das Medium, in welches das Myzel geimpft wird, eine gewisse Mindestmenge Biotin enthält, kann das Myzel dieses Synthetisierungsvermögen wiedergewinnen. Ist der Biotingehalt des Mediums dagegen geringer, so kann zwar ein gewisses Wachstum erfolgen, aber bloss, bis das vorhandene Biotin verbraucht ist. Die „Schockwirkung", welche die Impfung selbst zur Folge hat, würde also nur die Fähigkeit des Pilzes zur Synthetisierung von Biotin betreffen, nicht die übrigen Funktionen, die das Wachstum ermöglichen.

Nehmen wir dagegen an, dass das Myzel kein Biotin bildet, wenn es auf dem biotinreichen Malzagar wächst, so müssen wir uns folgenden Verlauf denken: Wenn das Myzel durch die Impfung in das neue Medium

gebracht ist, so ist es, wie als es auf dem Malzagar wuchs, hinsichtlich seines Wachstums ganz von dem Biotin abhängig, welches das Medium enthält. Erreicht die Biotinkonzentration des Mediums nicht den oben genannten Schwellenwert, so wird bloss die der vorhandenen Biotinmenge entsprechende Myzelquantität gebildet, und danach hört das Wachstum auf. Enthält das Medium dagegen eine etwas grössere Menge Biotin, so hat das Myzel, während das Biotin verbraucht wird, längere Zeit Gelegenheit, sich an ein immer biotinärmer werdendes Substrat „anzupassen". Diese „Anpassung" bedeutet, dass die latente Fähigkeit des Myzels zur Synthetisierung von Biotin ausgelöst wird.

Dass die Impfmethodik (die Zerstückelung des Myzels) einen solchen Effekt haben sollte, wie ihn die erste Alternative voraussetzt, halte ich für unwahrscheinlich. Deshalb erscheint es mir am glaubhaftesten, dass das Myzel von *M. androsaceus* kein Biotin bildet, wenn es auf Malzagar wächst, dass es aber durch Züchtung auf einem allmählich immer biotinärmer werdenden Medium dazu gebracht werden kann, diesen Wuchsstoff zu bilden. Dagegen ist es nicht wahrscheinlich, dass eine Biotinsynthese in Gang kommt, wenn das Myzel in einer Nährlösung mit hoher (supraoptimaler) Biotinkonzentration gezüchtet wird. Der Pilz ist meiner Ansicht nach wahrscheinlich als eine biotinheterotrophe Art zu bezeichnen, die jedoch — mit grösster Wahrscheinlichkeit — unter gewissen Umständen zu Biotinautotrophie übergehen kann.

Wenn die hier gegebene Deutung richtig ist, dürfte *M. androsaceus* Biotin auch dann nicht synthetisieren, wenn er auf Streu in der Natur wächst.

Die Enzyme, die ein Mikroorganismus bilden kann, lassen sich nach Karström (1930, 1938) in zwei Gruppen einteilen: die konstitutiven Enzyme, die unabhängig von der Zusammensetzung des Substrats immer gebildet werden, und die adaptiven, die nur bei Bedarf gebildet werden, d. h. deren Bildung in den Zellen durch eine Anpassung an das betreffende Substrat bedingt ist. Ein Beispiel eines adaptiven Enzyms bei Hefe ist das Galaktose vergärende Enzym Galaktosezymase (Söhngen & Coolhaas 1924). v. Euler & Johansson (1912), Kluyver (1914) sowie Söhngen & Coolhaas (1924, 1926) stellten fest, dass Hefe, die aus einer Nährlösung mit Glykose in eine Lösung mit Galaktose verbracht wurde, erst allmählich begann, Galaktosezymase zu bilden, und dass diese Neubildung des Enzyms mit grösster Wahrscheinlichkeit auf einer Neubildung von Hefezellen beruhte. Eine entsprechende Erfahrung machte Karström (1930) auf dem bakteriologischen Gebiet: *Bact. aerogenes*, welches in laktosehaltigem Medium gezüchtet worden war, konnte nur dann zum Vergären einer Xyloselösung gebracht werden, wenn diese eine Stickstoffquelle enthielt, so dass

eine Neubildung von Zellen oder wenigstens von Protoplasma stattfinden konnte.

Mag nun das Biotin als Komponente in einem Enzymsystem enthalten sein oder nicht, so scheint mir die Annahme einleuchtend, dass auch die Anpassung an Biotinautotrophie, die bei *M. androsaceus* unter gewissen Bedingungen einzutreten scheint, mit einer Neubildung von Protoplasma und Zellen verbunden ist. Es ist meiner Ansicht nach denkbar, dass diese Anpassung in einer langsamen, sukzessiven physiologischen Veränderung der in einer immer biotinärmeren Lösung wachsenden Pilzzellen besteht. Die Ursache, dass die Anpassung bloss in einer Lösung erfolgen kann, die eine gewisse Mindestmenge Biotin enthält, ist dann denkbarerweise folgende: Die Myzelentwicklung, die in einer Lösung erfolgen kann, deren Biotinmenge nicht die eben erwähnte Mindestmenge erreicht, ist quantitativ so gering und findet während so kurzer Zeit statt, dass der Anpassungsprozess nicht vor sich gehen kann, bevor das Wachstum infolge Biotinmangels aufhört.

Mehrere Autoren haben festgestellt, dass Biotin (Vitamin H) in natürlichem Material in nicht wasserlöslicher Form vorkommt. Kögl & Tönnis (1936), die bei der Darstellung von Biotin von chinesischem Enteneigelb ausgingen, konstatierten, dass sich der Wuchsstoff nur ganz unbedeutend in kaltem Wasser löste. Erst durch wiederholtes, stundenlanges Kochen des Materials mit Wasser konnte das Biotin in grösserer Menge in Lösung gebracht werden. György (1937) stellte Vitamin H aus Leber her. Um das Vitamin in wasserlösliche Form zu überführen, musste das Material mit einem proteolytischen Enzym behandelt oder durch Erhitzen unter Überdruck in saurer Lösung hydrolysiert werden. Nach jetzt patentierten Methoden für Herstellung von Vitamin H wird auch das Ausgangsmaterial erst einer Enzymbehandlung oder Hydrolyse unterworfen (Vogel 1943).

Nach dem, was man hiernach über die Art des Vorkommens von Biotin weiss, und im Hinblick auf meine eigenen Resultate erscheint es mir denkbar, dass das Biotin in den lebenden Zellen, an Eiweiss gebunden, eine Komponente eines heterogenen Systems von wesentlicher Bedeutung für das Wachstum ist.

Heterogene Systeme spielen bekanntlich eine sehr bedeutsame Rolle für die Lebensprozesse der Zellen. Ich will hier bloss einige wenige frühere Untersuchungen erwähnen, aus denen hervorgeht, dass hochaktive Stoffe in einer nicht wasserlöslichen Phase in solchen Systemen enthalten sind.

Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang Dagys' Untersuchungen über Hefewuchsstoffe (Dagys 1937, 1938). Dieser Forscher fand unter anderm, dass Kleberproteine in Weizensamen gebundene Hefewuchsstoffe enthielten, die durch Proteolyse freigemacht werden konnten.

Oparin (1937) und seine Mitarbeiter untersuchten die Art des Vorkommens von Invertase in verschiedenen Pflanzenteilen und fanden, dass sich dieses Enzym teils in freiem Zustand im Zellsaft gelöst, teils in gebundenem Zustand an die Zellstruktur adsorbiert findet. Nur im letzteren Fall wirkte das Enzym synthetisierend.

Nilsson (1941) kam durch vergleichende Studien über Zuckergärung durch frische Hefe, Trockenhefe und Mazerationssaft von Hefe zu dem Ergebnis, dass die durch den Zymasekomplex hervorgerufenen Reaktionen in den lebenden Hefezellen durch einen Organisator koordiniert werden, der aus gewissen Stoffen oder Stoffgruppen besteht. Diese organisierenden Stoffe, die möglicherweise von lipoidartiger Natur sind, sind in einer nicht wasserlöslichen Phase Bestandteile eines heterogenen Systems.

Ist das Biotin der Pilze an Eiweiss in der Zellstruktur gebunden, so dürfte es sehr schwer zu transportieren sein. Auf diese Weise würde sein quantitativer Effekt seine Erklärung finden.

Nach der obigen Auffassung können auch gewisse bisher nicht erörterte Resultate der Versuche 16 und 19 eine einleuchtende Erklärung erhalten. So zeigte sich bei Versuch 16, dass die Wachstumsgeschwindigkeit in der Reihe mit 10 mγ Biotin je Kolben anfangs ebenso gross war wie in den Reihen mit 50 und 100 mγ je Kolben, während sie im späteren Teil des Versuchs geringer war als in den Reihen mit den höheren Biotinkonzentrationen. In diesem Fall dürfte das Biotin in der 10-mγ-Reihe im ersten Teil des Versuchs verbraucht worden sein. Das Myzel war deshalb in dieser Reihe im späteren Teil des Versuchs für sein Wachstum ganz auf seine eigene Biotinsynthese angewiesen. In den beiden andern Reihen war die Biotinkonzentration dagegen so hoch, dass dem Pilz während der ganzen Versuchsdauer Überschuss von Biotin zur Verfügung stand. Infolgedessen war die Wachstumsgeschwindigkeit im späteren Teil des Versuchs in den beiden letztgenannten Reihen am grössten.

In Versuch 18 war die Wachstumsgeschwindigkeit in der Reihe mit 6 mγ Biotin je Kolben während des ersten Versuchsmonats grösser als in der mit 4 mγ Biotin je Kolben. Im späteren Teil des Versuchs wuchs dagegen der Pilz in diesen beiden Reihen mit ungefähr derselben Geschwindigkeit. Die Biotinkonzentrationen waren hier suboptimal, und solange ein Unterschied zwischen den Konzentrationen der beiden Reihen bestand, waren die Wachstumsgeschwindigkeiten auch verschieden. Nach ungefähr einem Monat dürfte indes das zugesetzte Biotin in beiden Reihen verbraucht gewesen sein, worauf das Wachstum, das nun ganz auf der Biotinsynthese des Myzels selbst beruhte, unter identischen Bedingungen stattfand und die Wachstumsgeschwindigkeit in beiden Reihen gleich gross wurde.

Man kann die Frage aufwerfen, in welchem Grade die übrigen Pilze,

welche Biotin „brauchen", tatsächlich biotinheterotroph sind. Es erscheint ja nicht ausgeschlossen, dass es auch absolut biotinheterotrophe Typen gibt, denen die Fähigkeit, Biotin zu bilden, gänzlich fehlt, und auf die dieser Wuchsstoff unabhängig von der Konzentration eine deutlich quantitative Wirkung hat.

D. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration.

Nachdem Sörensen (1909) den grossen Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf enzymatische Prozesse nachgewiesen, verbesserte Methoden für ihre Bestimmung ausgearbeitet und durch Einführung des pH-Begriffes eine einfache Bezeichnung für ihren numerischen Wert geschaffen hatte, wurden allmählich von verschiedenen Forschern eine Reihe Arbeiten über ihre Bedeutung für das Wachstum verschiedener Pflanzen veröffentlicht.

Mehrere Untersuchungen über die Wirkung des pH auf die Sporenkeimung und das Wachstum der holzzersetzenden Hymenomyzeten unter kontrollierten Bedingungen sind von Duggar und seinen Schülern ausgeführt worden (Zeller, Schmitz & Duggar 1919; Webb 1919, 1921; Wolpert 1924). Der Einfluss des pH auf das Wachstum der mykorrhizabildenden Hymenomyzeten wurde von Melin (1924, 1925) studiert. Unter den Untersuchungen über die Abhängigkeit der niederen Pilze von der Wasserstoffionenkonzentration seien die Arbeiten von Hopkins (1922), Lundegårdh (1923, 1924) und Lindfors (1924) über gewisse Fusarien erwähnt. Später haben Reitsma (1932), Robak (1933), Treschow (1938) und andere die Abhängigkeit gewisser holzzersetzender Pilze sowie Modess (1941) die gewisser Mykorrhizapilze von der Wasserstoffionenkonzentration behandelt. (Eine ausführliche Übersicht über die Literatur betreffend die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration auf die holzzersetzenden Pilze findet sich bei Bavendamm 1936, S. 1062–1067.)

Alle diese Untersuchungen haben ergeben, dass verschiedene Arten untereinander grosse Unterschiede in ihrem Verhalten zum pH des Mediums aufweisen können. Die von mir untersuchten *Marasmius*-Arten kommen in der Natur auf Streumaterial von sehr wechselnder Art und sehr verschiedenem Säuregrad vor. Man kann deshalb von vornherein erwarten, dass auch diese Pilze ziemlich ungleichartige Forderungen an die Wasserstoffionenkonzentration des Substrats stellen. Da eine gewisse Kenntnis von der Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für das Wachstum der Pilze von grosser Wichtigkeit für die Beurteilung ihrer Entwicklung in verschiedenen Nährlösungen ist, beschloss ich, in einer Versuchsreihe die Abhängigkeit der *Marasmius*-Arten von diesem Faktor zu studieren.

Die Züchtung von Pilzen bei unveränderter Wasserstoffionenkonzentration stösst auf erhebliche Schwierigkeiten, weil die Myzelien durch ihren Stoffwechsel gewöhnlich die Reaktion des Substrats mehr oder minder stark verändern. Oft sind diese Reaktionsveränderungen in der einen oder anderen Weise von den im Substrat enthaltenen Stickstoffverbindungen abhängig. Wie bereits bemerkt (S. 45), verschiebt sich die Reaktion in einer Lösung, die ein NH_4-Salz als Stickstoffquelle enthält, gewöhnlich in saurer Richtung, was darauf beruht, dass die NH_4-Ionen des Salzes rascher aufgenommen werden als die Anionen. Andererseits kann sich die Reaktion in einer nitrathaltigen Lösung durch Aufnahme von NO_3 in alkalischer Richtung verschieben (Ritter 1909, 1911; Hagem 1910 u. a.). Verwendet man eine organische Stickstoffverbindung, z. B. Pepton, als Stickstoffquelle, so kann sich die Reaktion durch Abspaltung von NH_3 in alkalischer Richtung verschieben. Dies scheint besonders der Fall zu sein, wenn die organische Stickstoffverbindung gleichzeitig als Kohlenstoffquelle dient, oder wenn sie eine relativ starke Konzentration im Verhältnis zu dem zugesetzten Zucker hat (vgl. Hagem 1910, Klotz 1923). In saurer Richtung kann die Reaktion auch dadurch verschoben werden, dass die Pilze im Zusammenhang mit dem Energieumsatz organische Säuren bilden. Diese Säurebildung kann bei verschiedenen Arten sehr verschieden sein. Sie ist auch abhängig von der Natur der Kohlenstoffquelle (Boas & Leberle 1918 a, b; Boas 1919 a, b) sowie vom pH und den Puffereigenschaften der Lösung (Sakamura 1924, 1927).

Um das pH während der Versuchszeit möglichst konstant zu halten, kann man verschiedene Methoden anwenden. Man kann die Organismen auf natürlichen wuchsstoffhaltigen Substraten züchten, die an sich selbst Puffereigenschaften haben, und deren pH durch Zusätze von Säuren bzw. Basen die gewünschten Anfangswerte erhält. Als Grundsubstrat hat man unter anderm 2 %ige Peptonlösung (Lundegårdh 1923, 1924) und 3 %ige bzw. 5 %ige Malzextraktlösung (Treschow 1938 bzw. Melin 1924, 1925) benutzt. Von diesen beiden Substraten hat besonders Malzextrakt eine ziemlich gute Pufferwirkung. Robak (1933) züchtete gewisse Polyporazeen auf Kiefernsägespänen, deren pH durch Zusatz von HCl bzw. Na_2CO_3 reguliert wurde. Auf diesem Substrat verursachten die Pilze ziemlich unbedeutende pH-Verschiebungen.

Will man den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum der Pilze in definierten synthetischen Nährlösungen studieren, so muss man das pH durch Zusatz besonderer Pufferlösungen regulieren.

Die von Sörensen (1909) für biochemische Zwecke ausgearbeiteten Pufferlösungen enthielten als Puffersubstanzen entweder Phosphate, Borate, Zitrate oder Glykokoll. Später hat man andere Pufferlösungen vorgeschla-

gen, die in mehreren Fällen als Modifikationen von Sörensens Lösungen betrachtet werden können (siehe u. a. Palitzsch 1915, McIlvaine 1921, Kolthoff & Vleeschhouwer 1926). Jedoch eignen sich nicht alle diese Lösungen gleich gut für Wachstumsversuche mit Pilzen.

Die Boratlösungen umfassen nicht das saure pH-Gebiet, in dem die meisten Hymenomyzeten ihr Wachstumsoptimum haben. Glykokoll ist eine gute Stickstoffquelle für verschiedene Pilze, die bei ihrem Wachstum diese Aminosäure verbrauchen. Pufferlösungen, welche Glykokoll enthalten, sind deshalb für Züchtungsversuche mit solchen Organismen nicht geeignet. Sörensens Zitratpuffer umfasst das pH-Gebiet, in dem die Pilze wachsen können, und in Verbindung mit der bei dieser Untersuchung benutzten Nährlösung ist er auch anwendbar. Unter gewissen Bedingungen üben indes Zitrate eine ausgesprochen hemmende Wirkung wenigstens auf manche Pilze aus. Ich habe deshalb diesen Puffer nur bei wenigen Versuchen verwendet. Sörensens Phosphatpuffer, der aus 1/15 mol. KH_2PO_4 + 1/15 mol. Na_2HPO_4 in verschiedenen Proportionen besteht, umfasst das pH-Gebiet von ca. 4,5 bis ca. 8. Durch Ergänzung desselben mit Mischungen von 1/15 mol. KH_2PO_4 + 1/10-n HCl (Garder & Hagem 1919/20) kann man Lösungen mit pH-Werten herstellen, die das ganze Gebiet repräsentieren, in dem Wachstum für Hymenomyzeten möglich ist.

Garder & Hagem (l. c.) untersuchten den Einfluss von Sörensens Phosphatpuffer in verschiedenen Konzentrationen auf Nitrifikationsbakterien und fanden, dass ein Zusatz von 3 Teilen dieser Lösung zu 2 Teilen Nährlösung lebhafte Nitrifikation ermöglichte, während gleichzeitig die Pufferwirkung hinreichend stark war. Wurde die Pufferlösung in stärkeren Konzentrationen zugesetzt, so wurde die Nitrifikation gehemmt; dagegen fanden bei Zusatz derselben in schwächeren Konzentrationen erhebliche pH-Verschiebungen statt.

Ich selbst habe bei ein und demselben pH eine *Marasmius*-Art, *M. graminum*, in einer Nährlösung mit und ohne Zusatz von Phosphatpuffer gezüchtet. Dieser Versuch, über den in anderem Zusammenhang berichtet wird (siehe S. 141), zeigte, dass die Phosphatlösung, zugesetzt in einer Konzentration von 3 Teilen Phosphatlösung auf 2 Teile Grundlösung, die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes nur ganz unbedeutend herabsetzte.

Von den genannten Pufferlösungen scheinen also die Phosphatmischungen diejenigen zu sein, die sich am besten für Wachstumsversuche wie die hier in Rede stehenden eignen. Ich benutzte deshalb zur Regulierung des pH bei meinen Versuchen 1/15 mol. KH_2PO_4 + 1/15 mol. Na_2HPO_4 sowie 1/15 mol. KH_2PO_4 + 1/10-n HCl. Im Hinblick auf Garders &

HAGEMS und meine eigenen oben erwähnten Resultate setzte ich zu 2 Volumenteilen Nährlösung (Grundlösung) 3 Volumenteile Pufferlösung (schliessliche Phosphatkonzentration in den KH_2PO_4 / Na_2HPO_4-Reihen also 1/25 mol.).

Wenn man ein Medium anstrebt, dessen pH sich so wenig wie möglich durch das Wachstum der Pilze verändert, ist, wie oben bemerkt, die Wahl der Stickstoffquelle von grösster Bedeutung. Es ist klar, dass NH_4-Salze starker Säuren vermieden werden müssen. Am besten dürfte es sein, eine organische Stickstoffverbindung zu wählen und davon eine im Verhältnis zur Zuckermenge relativ geringe Quantität zuzusetzen.

In Versuch 1 (S. 44) zeigten sämtliche untersuchte *Marasmius*-Arten ziemlich gutes Wachstum in der Nährlösung, die Asparagin als Stickstoffquelle enthielt, und die pH-Verschiebungen waren in dieser Reihe relativ klein. Deshalb beschloss ich, bei meinen Untersuchungen über den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum der *Marasmius*-Arten Asparagin als Stickstoffquelle zu verwenden. Da die Konzentration der Stickstoffverbindung relativ niedrig im Verhältnis zu der des Zuckers sein muss, setzte ich das Asparagin in der Konzentration 0,1 % und den Zucker in der Konzentration 1 % zu.

Bei Zusammensetzung der Grundlösung suchte ich grösstmögliche Rücksicht auf den Bedarf der Pilze an verschiedenen Metallen zu nehmen (vgl. S. 116 ff.). Damit sämtliche Reihen Na- und Cl-Ionen enthielten, wurde der Grundlösung auch NaCl zugesetzt.

Damit die pH-Verschiebungen in Versuchen von diesem Typus so klein wie möglich werden, muss man relativ kurze Versuchszeiten wählen. Im vorliegenden Fall wurden sie einigermassen der Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Arten angepasst.

Um die Abhängigkeit des Wachstums von der Wasserstoffionenkonzentration graphisch zu veranschaulichen, hat man im allgemeinen Diagramme gezeichnet, in denen die pH-Werte für die verschiedenen Reihen zu Beginn der Versuche auf der Abzisse und die entsprechende Myzelproduktion auf der Ordinate abgesetzt sind (siehe z. B. WOLPERT 1924, MODESS 1941). Diese Darstellungsart, bei der keine Rücksicht auf die pH-Verschiebungen genommen wird, die während der Versuche stattfinden, gibt ein unvollständiges Bild der Versuchsresultate und kann leicht zu unrichtigen Schlüssen führen. Deshalb habe ich die Erntekurven sowohl gegen die Anfangs-pH-Werte (ausgezogene Kurven) als auch gegen die End-pH-Werte (gestrichelte Kurven) gezeichnet. Auf diese Weise angefertigte Diagramme zeigen die pH-Verschiebungen, die im Verlauf der Versuche in den verschiedenen Lösungen erfolgt sind, d. h. die pH-Grenzen, zwischen denen das Wachstum in jeder Reihe vor sich gegangen ist.

Versuch 22. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum der Pilze (Tab. 33, Fig. 13–15).

Grundlösung:

Glykose	10	g
Asparagin	1	g
KH_2PO_4	0,35	g
K_2HPO_4	0,15	g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5	g
$FeCl_3$-Lösung (Fe-Konz. 1/500)	0,5	ccm
$ZnSO_4$-Lösung (Zn-Konz. 1/500)	0,5	ccm
$CaSO_4 . 2 H_2O$	0,1	g
$MnSO_4 . 4 H_2O$	0,01	g
NaCl	0,5	g
Aneurin	50	γ
H_2O (dest.)	400	ccm

Die Zusammensetzung der verschiedenen Pufferlösungen, mit denen das pH der Grundlösung auf die Werte 2, 3, ... 8 gebracht werden konnte, wurde bestimmt (vgl. Lindeberg 1939 b, Modess 1941). Von diesen Pufferlösungen wurden die erforderlichen Mengen bereitet, die dann autoklaviert wurden. Gleichzeitig wurde eine Anzahl grössere Kolben mit einem bestimmten Volumen Grundlösung autoklaviert. Jedem der letztgenannten Kolben wurde nach dem Autoklavieren aseptisch $1\,^1/_2$ Volumen der betreffenden Pufferlösungen zugesetzt. Die so bereiteten Lösungen wurden mit sterilen Pipetten so auf trockensterilisierte 100-ccm-Kolben verteilt, dass in jeden Kolben 20 ccm kamen. Jedem der Kolben, die mit *M. androsaceus* geimpft werden sollten, wurde 1 ccm sterilisierte Biotinlösung (10 mγ/ccm) zugesetzt. 6 Parallelkolben.

Die verschiedenen Arten zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen gewisse Unterschiede hinsichtlich der Lage des pH-Optimums sowie hinsichtlich der pH-Grenzen, innerhalb deren Wachstum möglich war. Mit Rücksicht hierauf versuchte ich, die Pilze in einer Serie anzuordnen. Diese beginnt mit den Arten, die ihr Optimum bei neutraler oder schwach saurer Reaktion hatten und sich gleichzeitig am empfindlichsten gegen stärkere Wasserstoffionenkonzentrationen erwiesen, und endet mit denen, deren Optimum am stärksten nach der sauren Seite verschoben war, und die am resistentesten gegen höhere Wasserstoffionenkonzentrationen waren.

Die erste Art in dieser Serie ist *M. graminum*. Das Optimum lag für diesen Pilz zwischen den pH-Werten 6 und 7 (vgl. auch S. 138), und das Wachstum wurde vollständig in einer Lösung mit pH 2,9 gehemmt. Auch *M. rotula*, *M. epiphyllus* und *M. chordalis* wiesen ein gewisses Wachstum beim Neutralpunkt auf und wurden bei einem pH-Wert von 2,8–2,9 vollständig gehemmt. Das Optimum lag für *M. rotula* im pH-Gebiet 5–7, für *M. epiphyllus* im Gebiet 5–6 und für *M. chordalis* ungefähr bei pH 5.

Tabelle 33.

Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum der Pilze
(Versuch 22).

Anf.-pH	End-pH	Trockengewicht mg
a) *M. alliaceus.* Versuchszeit 30 Tage.		
2,1	2,1	0,1 ± 0,0
2,9	2,9	2,8 ± 0,1
4,0	4,1	8,5 ± 0,5
5,0	5,0	9,2 ± 0,6
6,0	5,8	7,8 ± 0,7
6,9	6,8	1,2 ± 0,2
b) *M. androsaceus* C. Versuchszeit 26 Tage.		
2,0	2,0	1,9 ± 0,1
2,9	2,8	18,9 ± 1,1
3,9	3,2	25,0 ± 0,8
5,2	3,8	24,5 ± 1,7
5,9	5,0	15,8 ± 0,5
6,9	6,8	0,5 ± 0,1
c) *M. chordalis.* Versuchszeit 27 Tage.		
2,9	2,9	0,2 ± 0,0
3,9	3,9	6,5 ± 0,3
5,2	4,9	11,1 ± 0,4
5,9	5,9	8,4 ± 0,1
6,9	6,9	1,6 ± 0,1
7,7	7,7	0,1 ± 0,0
d) *M. epiphyllus.* Versuchszeit 15 Tage.		
2,1	2,1	0,2 ± 0,0
2,9	2,9	0,3 ± 0,0
4,0	3,9	9,6 ± 1,6
5,0	4,8	40,8 ± 2,2
6,0	5,4	41,6 ± 2,1
6,9	6,4	9,2 ± 0,6

Anf.-pH	End-pH	Trockengewicht mg
e) *M. foetidus* A. Versuchszeit 16 Tage.		
2,1	2,1	1,0 ± 0,1
2,9	2,8	3,2 ± 0,1
4,0	3,1	5,0 ± 0,1
5,0	3,3	4,2 ± 0,2
6,0	5,4	2,7 ± 0,2
6,9	6,9	0,1 ± 0,0
f) *M. fulvobulbillosus* C. Versuchszeit 25 Tage.		
2,0	2,0	0,2 ± 0,0
2,9	2,9	0,8 ± 0,1
3,9	3,5	3,9 ± 0,1
5,2	4,0	4,8 ± 0,4
5,9	5,2	5,0 ± 0,3
6,9	6,9	0,3 ± 0,0
g) *M. graminum.* Versuchszeit 12 Tage.		
2,9	2,9	0,1 ± 0,0
3,7	3,7	29,3 ± 1,0
4,8	4,8	62,6 ± 1,6
6,0	5,7	124,6 ± 1,8
6,9	6,4	121,7 ± 3,0
7,8	7,8	3,2 ± 0,5
h) *M. perforans* A. Versuchszeit 42 Tage.		
2,0	2,0	0,3 ± 0,0
2,8	2,8	2,1 ± 0,1
4,0	3,9	10,2 ± 1,2
4,8	4,5	7,8 ± 0,6
5,8	5,6	1,0 ± 0,1
6,8	6,7	0,2 ± 0,0

Tabelle 33, Forts.

Anf.-pH	End-pH	Trockengewicht mg
i) *M. peronatus* A. Versuchszeit 18 Tage.		
2,1	2,1	0,3 ± 0,0
2,9	2,9	1,4 ± 0,1
4,0	3,8	3,8 ± 0,1
5,0	4,1	3,2 ± 0,1
6,0	5,8	2,5 ± 0,1
6,9	6,9	0,2 ± 0,0
j) *M. putillus.* Versuchszeit 42 Tage.		
2,0	2,0	0,6 ± 0,0
2,8	2,8	4,2 ± 0,3
4,0	3,7	9,9 ± 0,5
4,8	4,1	11,0 ± 0,7
5,8	5,6	3,0 ± 1,1
6,8	6,8	0,2 ± 0,0
k) *M. ramealis* C. Versuchszeit 20 Tage.		
2,0	2,0	0,1 ± 0,0
2,8	2,8	6,8 ± 0,3
4,0	3,9	9,9 ± 0,7
4,8	4,0	11,2 ± 0,4
5,8	5,0	8,4 ± 0,4
6,8	6,8	0,4 ± 0,0

Anf.-pH	End-pH	Trockengewicht mg
l) *M. rotula* C. Versuchszeit 20 Tage.		
2,8	2,9	0,2 ± 0,0
4,0	4,0	12,3 ± 0,4
4,8	4,9	31,0 ± 2,8
5,8	5,9	29,9 ± 1,4
6,8	6,7	25,3 ± 1,7
7,8	7,6	2,4 ± 0,2
m) *M. scorodonius* A. Versuchszeit 13 Tage.		
2,0	2,0	0,1 ± 0,0
2,9	2,8	4,2 ± 0,3
4,0	3,9	5,6 ± 0,5
5,2	4,8	10,2 ± 2,7
6,0	5,2	7,4 ± 0,4
6,9	6,9	0,2 ± 0,0

Die übrigen Arten zeigten wenigstens ein gewisses Wachstum, auch wenn die Nährlösung einen so niedrigen pH-Wert wie 3 hatte, wurden aber in der Regel vollständig bei neutraler Reaktion gehemmt. Einen Übergang zu dieser Gruppe bildet *M. alliaceus*, der ein gewisses Wachstum sowohl bei pH 3 als bei pH 7 zeigte, während die ziemlich weite Optimumzone zwischen pH 4 und 6 lag.

Die langsam wachsenden *M. fulvobulbillosus* und *M. peronatus* wuchsen am besten in dem pH-Gebiet 4–6. Der letztere hatte ein schwach markiertes Optimum bei pH 4. Für *M. scorodonius* lag das Optimum bei pH 5–6, aber auch bei pH 3–4 war das Wachstum ziemlich gut (vgl. S. 146). Sehr

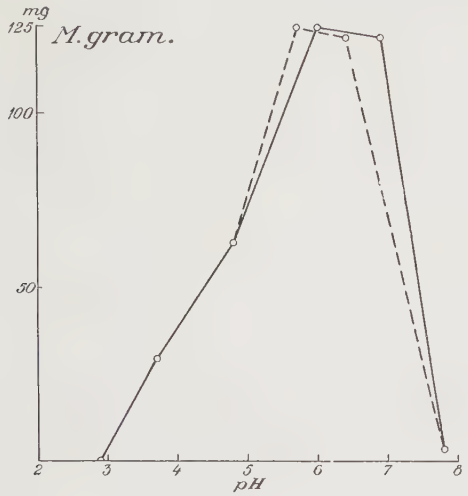

Fig. 13. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum von *Marasmius graminum* (Versuch 22).

grosse Toleranz gegen wechselnde Wasserstoffionenkonzentrationen zeigte *M. ramealis*, dessen Wachstumsgeschwindigkeit in dem pH-Gebiet 3–6 ziemlich gleichmässig war, mit einem schwach ausgesprochenen Maximum bei pH 4–5. *M. putillus* und *M. perforans* zeigten ein deutliches Optimum bei pH 4–5. *M. androsaceus* und *M. foetidus* endlich wuchsen bei pH 3 mit nur wenig geringerer Geschwindigkeit als bei höheren pH-Werten. Das Optimum lag für diese beiden Arten ungefähr bei pH 4. Sie verschoben das pH stärker als die übrigen Arten in saurer Richtung.

Die physiologische Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration ist in hohem Grade abhängig von der Konzentration der übrigen Ionen der Lösung (vgl. S. 136 ff., 162). Die pH-Kurven, welche in Versuch 22 für die verschiedenen Arten festgestellt wurden, können deshalb nicht mit Sicherheit unter anderen Bedingungen für gültig erachtet werden als denen, unter denen dieser Versuch ausgeführt wurde. Es ist indes von Interesse, die experimentell konstatierte Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze und die Wasserstoffionenkonzentration in den Substraten zu vergleichen, auf denen die Pilze in der Natur vorkommen.

Die Mehrzahl der hier behandelten Arten ist in der Natur an bestimmte Streuarten gebunden, über deren pH zahlreiche Angaben in der einschlägigen Literatur vorliegen. So fand Hesselman (1926, S. 248–251), dass abgestorbene Nadeln eine ausgesprochen saure Reaktion haben, während die Streu verschiedener Laubbäume in der Regel schwach saure bis

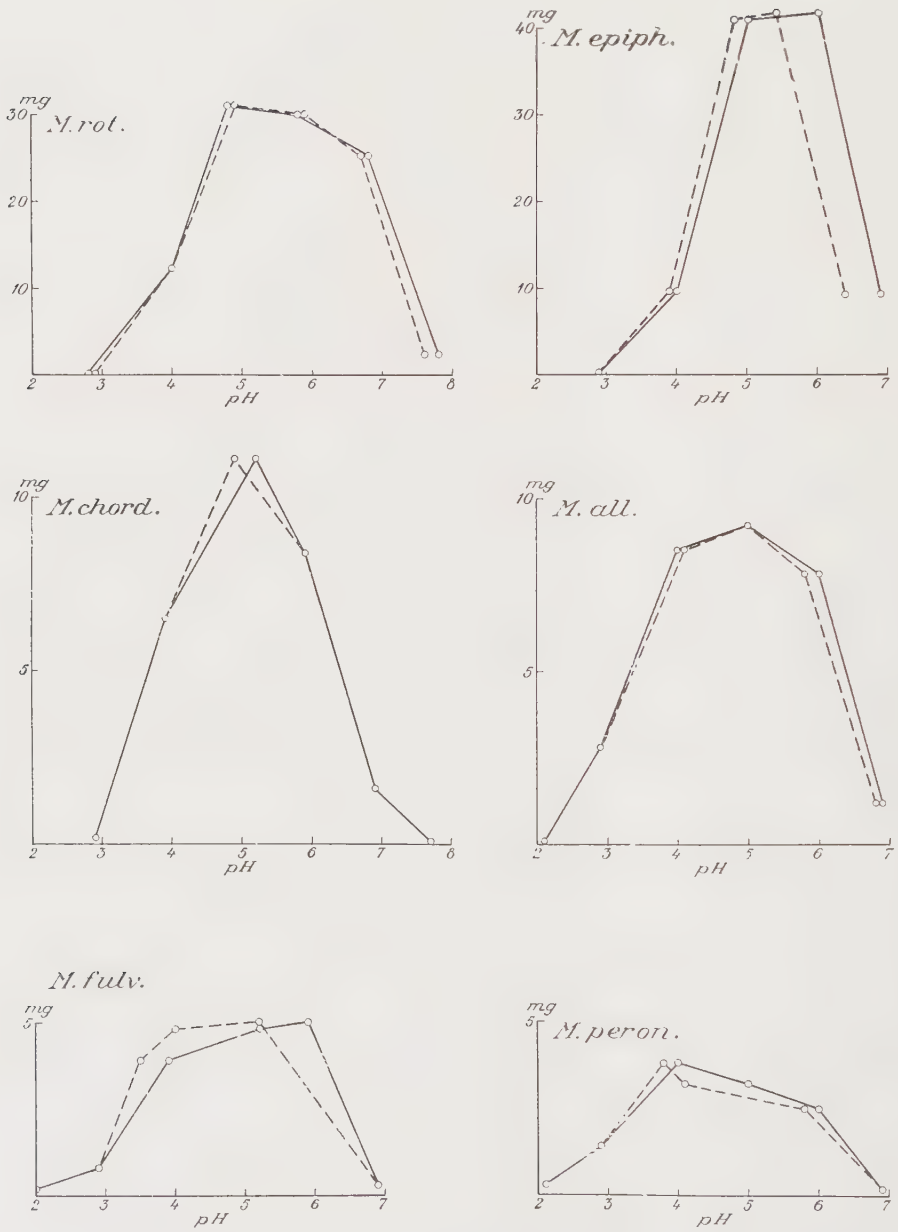

Fig. 14. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum verschiedener *Marasmius*-Arten (Versuch 22).

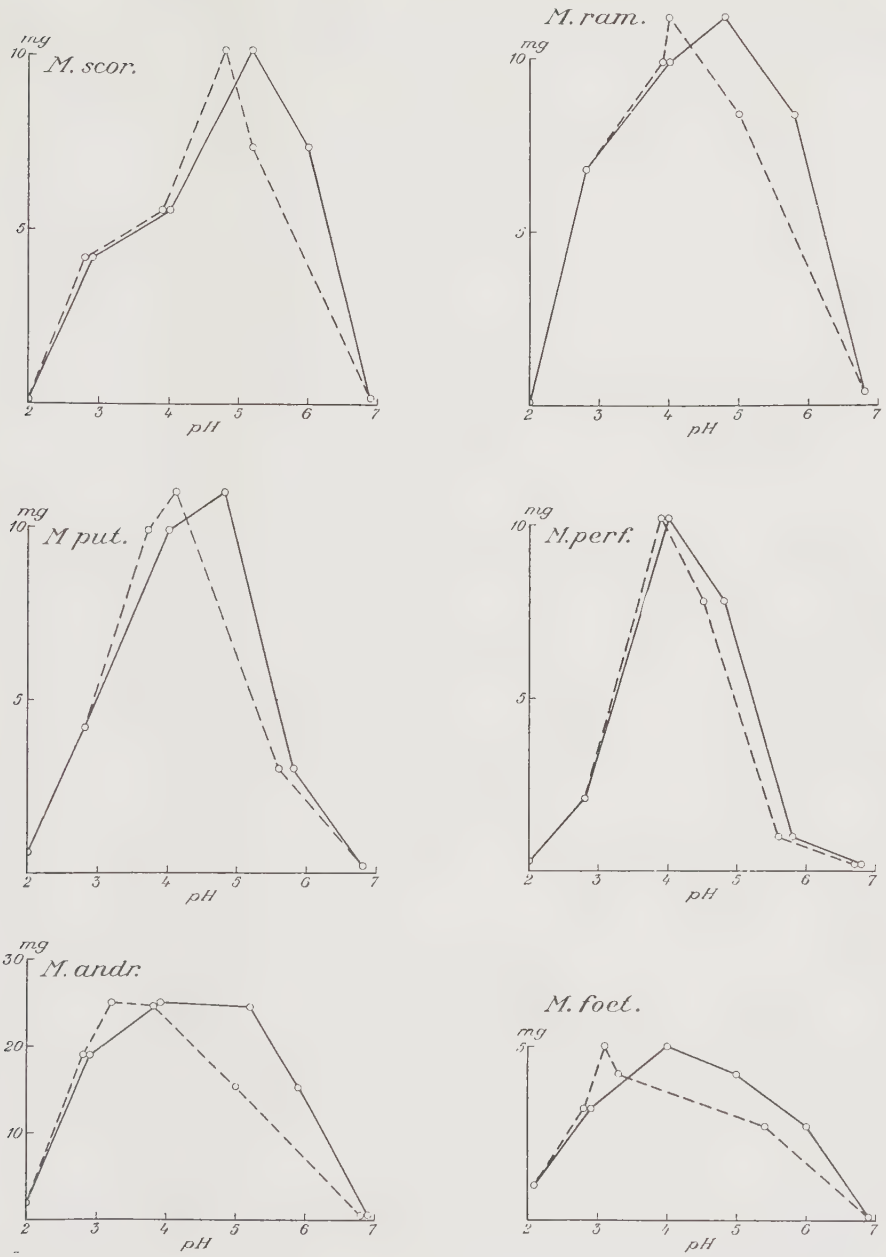

Fig. 15. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum verschiedener *Marasmius*-Arten (Versuch 22).

neutrale Reaktion hat. Er macht folgende Angaben: pH bei unzersetzten, herbstlich vergilbten Nadeln bzw. Blättern von Kiefer 4,0–4,2, von Fichte 3,8–4,2, von Espe 5,3–6,1 und von Buche 5,3–6,6. Nach Lindquist (1931) kann indes das pH der Vermoderungsschicht in *Vaccinium myrtillus*-reichen Buchenwäldern einen so niedrigen Wert wie 4,0 annehmen.

Von den untersuchten *Marasmius*-Arten können folgende als exklusive Nadelpilze bezeichnet werden: *M. androsaceus* und *M. putillus* (Kiefernnadeln) sowie *M. perforans* (Fichtennadeln). Bei den Versuchen lag das pH-Optimum für diese Arten in dem Gebiet 4–5. Die Übereinstimmung zwischen dem pH des natürlichen Substrats und dem experimentell gefundenen Optimum ist also in diesen Fällen eine gute.

Als Nadelpilze treten auch *M. peronatus* und *M. rotula* auf. Die erstere Art isolierte ich von Kiefernnadeln, die letztere von Fichtennadeln. Beide Arten kommen indes auch auf Laubbaumstreu vor, und *M. rotula* ist sogar auf solcher Streu gewöhnlicher als auf Nadelstreu (vgl. Ricken 1915, S. 80). Experimentell wurde für *M. peronatus* ein schwach ausgesprochenes Optimum bei pH 4 festgestellt, während das Wachstum auch bei pH 5 und 6 relativ gut war. *M. rotula* zeigte einigermassen gutes Wachstum bei pH 4, hatte eine ziemlich weite Optimumzone zwischen pH 5 und 7 und konnte auch in gewissem Umfang eine schwach alkalische Lösung assimilieren. Es konnte also ein gewisser Unterschied zwischen der pH-Kurve für *M. peronatus* und den entsprechenden Kurven für die exklusiven Nadelpilze festgestellt werden. *M. rotula* wich in sehr ausgesprochener Weise von den letzterwähnten Pilzen ab.

M. chordalis und *M. fulvobulbillosus* kommen gewöhnlich in grasreichem Nadelwaldgelände mit etwas mullartigerem Charakter als die reinen Rohhumusböden vor. Durch ihre Optimumzone zwischen pH 4 und 6 unterscheiden sich diese Arten auch von den exklusiven Nadelpilzen.

M. scorodonius wird sowohl auf Nadeln und Rinde als auf Stengelbasen und Wurzeln von Kräutern und Gräsern angetroffen. Bei diesem Pilz wurde auch grosse Toleranz gegen wechselnde Wasserstoffionenkonzentrationen festgestellt. Dasselbe gilt für *M. ramealis*, der in der Natur auf Ästen und Zweigen sowohl von Nadel- als Laubbäumen wächst.

Die für *M. alliaceus* konstatierte Optimumzone zwischen pH 4 und 6 steht in ziemlich gutem Einklang mit dem Vorkommen des Pilzes auf Buchenwaldstreu.

M. epiphyllus kommt auf vermodernden Blättern verschiedener Laubbäume vor, vor allem jedoch auf Espenlaub. Seine Kurve zeigt in guter Übereinstimmung hiermit ein Optimum zwischen pH 5 und 6.

M. graminum wächst in der Natur meist auf *Agropyron repens*. Für tote Blattscheiden und Blätter dieses Grases wurde von mir ein pH-Wert

von 7,0 festgestellt (1 Teil Probe + 2 Teile Wasser). Das experimentell gefundene Optimum für *Marasmius graminum* lag ja auch ganz nahe dem Neutralpunkt.

Marasmius foetidus, der wohl als holzzersetzender Pilz bezeichnet werden kann, wurde von vermoderndem Ulmenholz isoliert, für das ich beim Einsammeln des Materials einen so überraschend niedrigen pH-Wert wie 2,9 konstatierte (1 Teil Probe + 1 Teil Wasser). Experimentell wurde für diese Art ein stark nach der sauren Seite verschobenes Optimum nachgewiesen.

In diesem Zusammenhang sind gewisse von Wilkins, Harley & Kent (1938) veröffentlichte Resultate von Interesse. Diese Forscher studierten den Zusammenhang zwischen dem Vorkommen gewisser Hutpilze und dem pH des Substrats. Unter den untersuchten Arten befanden sich auch *Marasmius alliaceus*, *M. peronatus*, *M. ramealis* und *M. rotula*. *M. rotula* zeichnete sich durch grosse Toleranz gegen wechselnde Wasserstoffionenkonzentrationen aus und kam in dem pH-Gebiet 4,0–8,0 vor. Von 25 untersuchten Hutpilzen war diese Art diejenige, die bei den höchsten pH-Werten wuchs. Auch für *M. alliaceus* und *M. ramealis* war die Amplitude weit. Der erstere kam von pH 4,0 bis pH 7,5 vor, mit einem Maximum bei pH 4,0–5,0, der letztere in dem pH-Gebiet 3,5–7,0, mit einem Maximum bei pH 5,0–5,5. *M. peronatus* wuchs bei pH 4,0–5,5.

Die Übereinstimmung zwischen diesen Resultaten und den von mir experimentell festgestellten Kurven ist eine ziemlich gute. Besonders möchte ich darauf hinweisen, dass *M. rotula* in Versuch 22 gutes Wachstum bei pH 6,8–6,9 aufwies und auch in gewissem Umfang eine schwach alkalische Lösung assimilieren konnte, was gut mit dem von Wilkins, Harley & Kent (l. c.) konstatierten Vermögen des Pilzes im Einklang steht, auch auf einem schwach alkalischen Substrat zu wachsen.

Trotz der Einschränkung, die grundsätzlich hinsichtlich der Gültigkeit der experimentell festgestellten pH-Kurven unter anderen als den bei den Versuchen herrschenden Bedingungen gemacht werden muss, finden wir also, dass die Übereinstimmung zwischen diesen Kurven und den an den natürlichen Standorten der Pilze bestehenden pH-Verhältnissen eine gute ist. Obgleich die bei den Experimenten benutzten Lösungen insbesondere durch ihre relativ hohe Phosphatkonzentration erheblich von den Bodenflüssigkeiten abweichen dürften, die in den natürlichen Substraten der Pilze vorkommen, zeigt die eben erwähnte Übereinstimmung, dass sich die hier angewandte Methodik gut für das Studium der ökologisch bedeutsamen Abhängigkeit der Pilze von der Wasserstoffionenkonzentration eignet.

E. Der Einfluss von Kalzium, Mangan und Zink.

Bei seinen klassischen Untersuchungen über das Wachstum von *Aspergillus niger* kam RAULIN (1869) zu dem Ergebnis, dass dieser Pilz, um in einer synthetischen Nährlösung wachsen zu können, ausser Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie den Elementen P, S, K und Mg auch einen Zusatz von Si, Zn und Fe brauchte. Dagegen glaubten MOLISCH (1894) und BENECKE (1894, 1895) feststellen zu können, dass die niederen Pilze unter den Metallen nur K, Mg und Fe fordern. Gleichzeitig hoben sie hervor, dass Ca kein notwendiges Element für diese Organismen sei.

Die Frage der Bedeutung von Fe und Zn für die Mikroorganismen war lange sehr umstritten. Dass diese Metalle für *Aspergillus niger* notwendig sind, konnte erst ziemlich spät mit voller Sicherheit bewiesen werden (STEINBERG 1919, BORTELS 1927, ROBERG 1928, 1931). Mit Si erhielt auch RAULIN einen ganz schwachen Effekt, und die Bedeutung dieses Stoffes ist später — vermutlich wegen der Schwierigkeit, völlig Si-freie Lösungen herzustellen — nur in geringem Umfang Gegenstand von Untersuchungen gewesen.

Nach dem Erscheinen der oben erwähnten Arbeiten von MOLISCH und BENECKE war man also ziemlich allgemein der Ansicht, dass die Pilze dieselben „klassischen" Nährelemente brauchen wie die höheren Pflanzen, mit Ausnahme von Ca und — eventuell — von Fe. Dementsprechend nahmen die meisten älteren Forscher in ihre für Pilze bestimmten Nährlösungen ausser Kohlenstoff- und Stickstoffquellen bloss einige wenige Nährsalze auf. So enthielten PFEFFERS Nährlösungen ausser einer Kohlenstoff- und einer Stickstoffquelle (NH_4NO_3) nur Mg-Sulfat und ein K-Phosphat (PFEFFER 1895). RICHARDS (1897) und HAGEM (1910) setzten ausserdem kleine Mengen Fe-Salze zu. COONS' Nährlösung, die u. a. SCHOPFER und seine Mitarbeiter bei umfassenden Untersuchungen verwendeten (siehe SCHOPFER 1934 b, S. 512), enthält Zucker, Asparagin, $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ und KH_2PO_4. Zubereitet aus Chemikalien von gewöhnlichem Reinheitsgrad und ergänzt mit den erforderlichen Wuchsstoffen, ermöglichen solche einfache Nährlösungen ein mässiges Wachstum auch für viele Hymenomyzeten.

Mehrere Forscher entdeckten indes allmählich, dass die Wachstumsgeschwindigkeit in solchen Nährlösungen weder für höhere noch für niedere Pflanzen maximal war. Es schien, dass diese Lösungen gewisse Elemente, welche die Wachstumsgeschwindigkeit der Pflanzen gleichfalls wesentlich beeinflussen, in zu kleinen Mengen oder gar nicht enthielten. Als Komplement der gewöhnlichen Nährlösungen, welche bloss die Ele-

mente enthielten, die man seit langem als notwendig für die Pflanzen betrachtet hatte, schlug deshalb HOAGLAND im Jahre 1933 seine sog. A–Z-Lösung vor, die eine grössere Anzahl Elemente enthält, mit denen die Pflanzen, wie man annehmen kann, an ihren natürlichen Standorten in Berührung kommen. SCHROPP & SCHARRER (1933) wiesen die günstige Wirkung der A–Z-Lösung auf verschiedene Kulturpflanzen nach, wenn diese in synthetischen Nährlösungen gezüchtet wurden. Hier sei auch die Entdeckung von NIELSEN & HARTELIUS erwähnt, dass Filtrierpapierasche oder eine Mischung gewisser Metallsalze fördernd auf das Wachstum von *Aspergillus niger* wirkte, wenn dieser Pilz in einer autoklavierten Lösung gezüchtet wurde, welche Glykose und Salze gewisser organischer Säuren enthielt (NIELSEN & HARTELIUS 1932, 1933, 1935).

1. Der Einfluss der Mineralbestandteile in Streuextrakten.

MELIN (1943, 1944) hat kürzlich den Einfluss von Extrakten verschiedener Streuarten auf das Wachstum höherer Bodenpilze, besonders Mykorrhizapilze, untersucht und gefunden, dass solche Extrakte in nicht zu starken Konzentrationen das Wachstum der Pilze günstig beeinflussen. Eine nähere Untersuchung ergab, dass die Extrakte in den meisten Fällen sowohl durch ihre anorganischen als durch ihre organischen Bestandteile wirkten.

Sowohl vom physiologischen als vom ökologischen Gesichtspunkt ist der Einfluss der wasserlöslichen Bestandteile der Streu auf die streuzersetzenden Hymenomyzeten von grossem Interesse. Besonders dürfte ja eine Untersuchung des eventuellen Effekts, den die Mineralbestandteile von Streuextrakten auf das Wachstum der Pilze ausüben, die Kenntnis der für die Pilze bedeutsamen Metalle erweitern. In Versuch 23 studierte ich deshalb die Wirkung von Espenlaubextrakt und seiner salzsäurelöslichen Aschenbestandteile auf das Wachstum der *Marasmius*-Arten.

Versuch 23. Der Einfluss von Espenlaubextrakt und seiner salzsäurelöslichen Mineralbestandteile auf das Wachstum der Pilze (Tab. 34).

Gemahlene, kürzlich abgefallene Espenblätter wurden mit 5 Gewichtsteilen Wasser zwei Tage lang bei einer Temperatur von ca. 5° C extrahiert, worauf die Flüssigkeit von der Laubmasse abgesaugt wurde. Ein Teil des so erhaltenen Extrakts wurde direkt für Bereitung der Reihen d und e dieses Versuches benutzt. Der Rest des Extrakts wurde zu Trockenheit eingedunstet, die Trockensubstanz im elektrischen Ofen bei 600° C verascht und die Asche mit verdünnter HCl extrahiert, die durch doppeltes Destillieren in einer Apparatur aus Jenaer Geräteglas 20 gereinigt worden war. Die so erhaltene Asche-Lösung wurde partiell durch Zusatz von Na_2CO_3 neutralisiert und ihr Volumen so reguliert, dass es gleich dem Volumen des ursprünglichen Extrakts wurde, welches eingedunstet und verascht worden war. (Wegen

näherer Einzelheiten verweise ich auf MELIN 1944.) Der Espenlaubextrakt enthielt 21,6 mg Trockensubstanz je ccm. Diese Trockensubstanz enthielt 19,2 % Asche. Der Trockensubstanzgehalt der Asche-Lösung wurde nicht bestimmt.

Nährlösung A mit Zusatz von 0,5 g NaCl und 50 γ Aneurin je Liter.

Reihen: a) Kontrolle (pH 5,5).
b) 1 Vol.-% Asche-Lösung (pH 5,5).
c) 10 Vol.-% Asche-Lösung (pH 5,0).
d) 1 Vol.-% Espenlaubextrakt (pH 5,6).
e) 10 Vol.-% Espenlaubextrakt (pH 5,7).

Jedem der Kolben, die mit *M. androsaceus* geimpft wurden, wurden 10 mγ Biotin zugesetzt. 4 Parallelkolben.

Bei den meisten *Marasmius*-Arten bewirkte schon ein Zusatz von 1 Vol.-% Espenlaubextrakt eine Vervielfachung der Wachstumsgeschwindigkeit. Nur *M. foetidus* reagierte verhältnismässig schwach auf diesen Zusatz. Eine Erhöhung der Konzentration des Extrakts auf 10 Vol.-% führte bei der Mehrzahl der Arten eine weitere starke Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit herbei. Bei dieser Konzentration wuchs auch *M. foetidus* erheblich rascher als in der Kontrollreihe.

Auch die Aschenbestandteile des Extrakts förderten das Wachstum der Pilze stark, wenngleich in den meisten Fällen nicht so sehr wie der vollständige Extrakt. In Anwesenheit von 1 Vol.-% Asche-Lösung wuchsen die meisten Arten doppelt oder mehrfach rascher als in der Kontrollreihe. Die wachstumsfördernde Wirkung der Aschenbestandteile war schon bei dieser Konzentration maximal oder nahezu maximal für *M. alliaceus*, *M. chordalis*, *M. epiphyllus*, *M. fulvobulbillosus*, *M. graminum*, *M. perforans* und *M. rotula*. Bei *M. androsaceus*, *M. peronatus*, *M. putillus*, *M. ramealis* und *M. scorodonius* bewirkte dagegen eine Vermehrung der Asche-Lösungsmenge von 1 auf 10 Vol.-% eine mehr oder minder starke Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit.

Der Effekt des Extrakts beruhte also in der Regel sowohl auf seinen organischen als auf seinen anorganischen Bestandteilen. Bei *M. peronatus* scheint jedoch die gesamte Wirkung des Extrakts durch die anorganischen, bei *M. foetidus* dagegen hauptsächlich durch die organischen Bestandteile bedingt gewesen zu sein.

Aus Versuch 23 ging hervor, dass gewisse anorganische Salze, die in Espenlaubextrakt vorkommen und das Wachstum der Pilze günstig beeinflussen, in der verwendeten Nährlösung fehlen oder in suboptimalen Mengen vorhanden sind. Da der Effekt dieser Salze ausserordentlich gross war, schien es mir von Bedeutung, die Natur derselben etwas näher zu untersuchen.

Durch eine vollständige chemische Analyse der Asche-Lösung sowie eine Untersuchung des Einflusses der gefundenen Elemente je für sich

Tabelle 34.

Der Einfluss von Espenlaubextrakt und seiner salzsäurelöslichen Mineralbestandteile auf das Wachstum der Pilze (Versuch 23).

Versuchsobjekt	Versuchszeit in Tagen	Myzel-Trockengewicht in mg				
		Kein Zusatz	Asche-Lösung		Espenlaubextrakt	
			1 Vol.-%	10 Vol.-%	1 Vol.-%	10 Vol.-%
M. alliaceus	15	0,9 ± 0,1	6,3 ± 0,4	5,3 ± 0,6	19,5 ± 0,7	31,0 ± 0,6
M. androsaceus C. . .	20	10,1 ± 0,4	16,6 ± 0,4	20,7 ± 0,6	44,3 ± 1,4	80,4 ± 3,9
M. chordalis	15	0,4 ± 0,0	5,5 ± 1,0	7,1 ± 0,6	9,9 ± 0,7	41,1 ± 2,0
M. epiphyllus.	15	0,3 ± 0,0	11,0 ± 1,8	12,6 ± 4,2	22,7 ± 1,1	85,4 ± 5,2
M. foetidus A	15	7,6 ± 0,4	8,5 ± 0,8	10,1 ± 0,8	11,9 ± 0,4	25,4 ± 1,0
M. fulvobulbillosus B .	25	0,6 ± 0,1	2,3 ± 0,1	4,0 ± 0,7	6,1 ± 0,4	27,1 ± 0,3
M. graminum	12	21,3 ± 1,8	64,6 ± 2,4	57,4 ± 2,1	77,8 ± 1,2	198,3 ± 2,4
M. perforans A . . .	20	1,3 ± 0,2	5,0 ± 0,5	5,5 ± 0,7	29,8 ± 1,3	76,4 ± 2,2
M. peronatus A . . .	15	1,0 ± 0,2	5,5 ± 0,5	11,5 ± 0,5	4,3 ± 0,1	10,9 ± 0,5
M. putillus	20	0,8 ± 0,1	5,2 ± 0,4	13,4 ± 0,2	17,4 ± 1,2	33,0 ± 2,0
M. ramealis C	15	2,1 ± 0,2	4,3 ± 0,2	8,5 ± 0,2	9,6 ± 0,5	27,0 ± 1,0
M. rotula C	15	1,1 ± 0,2	21,2 ± 2,8	12,3 ± 1,0	22,0 ± 1,0	57,5 ± 1,6
M. scorodonius A. . .	15	1,7 ± 0,1	4,9 ± 0,6	9,4 ± 0,5	29,9 ± 1,0	32,5 ± 2,8

und in allen möglichen Kombinationen auf die Pilze könnte man sich Klarheit darüber verschaffen, welches die aktiven Stoffe dieser Lösung sind. Eine solche Untersuchung wäre indes zu umfangreich gewesen, um im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen werden zu können.

Indes kann man mit Sicherheit annehmen, dass gewisse Elemente in der Asche enthalten sind. Unter diesen sind hier besonders solche von Interesse, die nicht oder bloss als Verunreinigungen in der bei Versuch 23 verwendeten Nährlösung vorhanden sind, und die durch frühere Untersuchungen für physiologische Wirkungen verschiedener Art bekannt sind. Solche Stoffe sind Al, Ca, Cu und Mn.

In einem orientierenden Versuch studierte ich die Wirkung dieser Metalle auf *Marasmius rotula*, der in Versuch 23 sehr stark auf die Mineralbestandteile des Espenlaubextrakts reagierte. Um gleichzeitig eine gewisse Vorstellung von dem Effekt einer etwas grösseren Anzahl Elemente zu gewinnen, untersuchte ich in demselben Versuch auch den Einfluss von Hoaglands A–Z-Lösung auf denselben Pilz (Schropp & Scharrer 1933, S. 544). Ausser K-, Cl-, SO_4- und NO_3-Ionen enthält diese Lösung Ionen

Tabelle 35.

Der Einfluss verschiedener Metalle auf das Wachstum von *Marasmius rotula* C (Versuch 24).

Versuchszeit: 11 Tage.

Zusatz je Liter Nährlösung	Myzel-Trockengewicht in mg	pH 5,5 ↓
Kontrolle	0,5 ± 0,1	5,5
100 mg $CaCl_2$	5,4 ± 0,2	5,2
5 mg $MnSO_4 . 4 H_2O$ . . .	2,7 ± 0,3	5,4
1 mg $CuSO_4 . 5 H_2O$ . . .	0,6 ± 0,1	5,5
10 mg $Al_2(SO_4)_3 . 18 H_2O$ . .	0,6 ± 0,1	5,5
Ca + Mn + Cu + Al (Mengen wie oben	7,9 ± 0,4	5,1
1 ccm A–Z-Lösung	2,1 ± 0,2	5,5
10 ccm A–Z-Lösung	2,0 ± 0,2	5,4
10 ccm Asche-Lösung . . .	7,0 ± 0,8	5,1

der Elemente Li, Al, Ti, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, B, Br und J. Zum Vergleich wurde in einer Reihe auch dieselbe Asche-Lösung wie in Versuch 23 zugesetzt.

Versuch 24. Der Einfluss verschiedener Metalle auf das Wachstum von Marasmius rotula C (Tab. 35).

Nährlösung A mit Zusatz von 0,5 g NaCl und 50 γ Aneurin je Liter.
Der Versuch umfasste 9 Reihen, wie aus Tab. 35 hervorgeht. 4 Parallelkolben.

Der Versuch ergab sehr deutliche Resultate. Durch Zusatz von Ca wurde die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes fast ebensosehr gesteigert wie durch Zusatz von Asche-Lösung. Auch Zusatz von Mn hatte deutlichen Effekt. Dagegen beeinflussten Cu und Al die Wachstumsgeschwindigkeit nicht merklich. Zusammen hatten die Salze der vier Metalle eine ungefähr ebenso starke Wirkung auf den Pilz wie die Asche-Lösung. Auch die A–Z-Lösung hatte einen gewissen Effekt, der allerdings bei weitem nicht so stark war wie die Wirkung der Asche-Lösung oder die der Ca-, Mn-, Cu- und Al-Salze zusammen. Wahrscheinlich beruhte der Effekt der A–Z-Lösung hauptsächlich auf dem in ihr enthaltenen Mn.

2. Der Einfluss von Kalzium und Mangan.

Ausführliche Übersichten über die Literatur, welche die Bedeutung des Kalziums für die Pilze behandelt, finden sich bei Mann (1932) und Rippel & Stoess (1932).

Raulin (1869), Molisch (1894) und Benecke (1894, 1895) kamen zu dem Ergebnis, dass Ca kein notwendiges Element für Arten der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Mucor* sei. Spätere Forscher haben gewöhnlich Ca nicht in ihre für Pilze bestimmten Nährlösungen aufgenommen, und die Ansicht, dass die Pilze in der Regel dieses Metall nicht brauchen, hat allgemeinen Eingang in die botanischen Lehrbücher gefunden (Benecke & Jost 1924, S. 301; Kostytschew 1926, S. 267). Dass Ca kein für *Aspergillus niger* notwendiges Element ist, scheint auch aus neueren Untersuchungen hervorzugehen. So züchteten Bortels (1927) und Roberg (1928, 1931) diesen Pilz in Nährlösungen, die aus sehr sorgfältig gereinigten Salzen bereitet worden waren, ohne Zusatz von Ca, und Mann (1932) kam zu dem Ergebnis, dass Ca, wenn es überhaupt ein für *Aspergillus niger* notwendiges Element ist, bloss in ausserordentlich kleinen Mengen vorhanden zu sein braucht.

Rippel & Stoess (1932) untersuchten die Frage, ob Ca ein für Mikroorganismen notwendiges Element ist, und wählten als Versuchsobjekte eine Anzahl Bakterien sowie niedere Pilze. *Aspergillus niger* reagierte nur unter extremen Bedingungen (sehr hohe Mg-Konzentrationen) auf einen Zusatz von Ca. Mehrere der übrigen Arten reagierten indes deutlich auf Ca auch in Nährlösungen von gewöhnlicher Zusammensetzung. Die Verfasser sagen, dass Ca, wenn es auch kein für die Mikroorganismen generell notwendiges Element sei, doch ökologisch und „individualphysiologisch" von grosser Bedeutung für dieselben sein dürfte.

Über das Verhalten höherer Pilze zu Ca liegen nur wenige eingehendere Untersuchungen vor. Nach gewissen älteren Autoren soll Ca für *Morchella*-Arten (Fron 1905) und *Coprinus plicatilis* (Weir 1911) notwendig sein. Diese Forscher haben indes eine Methodik angewandt, die jetzt nicht als einwandfrei betrachtet werden kann, und ihre Resultate müssen deshalb mit gewisser Vorsicht beurteilt werden. Sowohl die Ergebnisse dieser letztgenannten Forscher als die von Rippel & Stoess zeigen indes, dass die Rolle des Ca für die Pilze nicht als endgültig geklärt angesehen werden kann.

Eine ausführliche Übersicht über die bisherigen Untersuchungen betreffend die Bedeutung des Mangans für die Pilze gibt Pirschle (1939, S. 274–276).

Bertrand & Javillier (1911 a, b, c) und Bertrand (1912 a, b), welche mit sorgfältig gereinigten Salzen arbeiteten, stellten fest, dass *Aspergillus niger* auf äusserst kleine Mengen Mn reagiert. Bertrand (1912 b) erhielt bei gewissen Versuchen eine Vervierfachung der Ernte durch Zusatz von 10 γ Mn je Liter. Noch in einer Konzentration von 0,1 γ je Liter hatte das Metall deutliche Wirkung. Auch für die Konidienbildung war

Mn von grosser Bedeutung. Die Verfasser zogen aus ihren Resultaten den Schluss, dass Mn ein für *Aspergillus niger* notwendiges Element ist.

Bei ihren grundlegenden Arbeiten über die Notwendigkeit von Fe, Zn und Cu für *Aspergillus niger* berücksichtigten weder STEINBERG (1919), BORTELS (1927) noch ROBERG (1928, 1931) die Bedeutung von Mn. Ihre Versuchsresultate deuten eher darauf hin, dass Mn für das Wachstum von *Aspergillus niger* nicht notwendig ist.

Später hat indes auch STEINBERG die Bedeutung des Mn für diesen Pilz untersucht. Im Jahre 1935 fand er (STEINBERG 1935 a, b), dass, wenn Mn von einer von Verunreinigungen durch schwere Metalle möglichst befreiten Nährlösung ausgeschlossen wurde, die nach 6 Tagen geerntete Myzelmenge von *Aspergillus niger* ungefähr die Hälfte der Ernte betrug, die nach Zusatz von 10 γ Mn je Liter erhalten wurde, und dass die Konidienbildung reduziert war. Zn und Fe hatten indes eine bedeutend stärkere Wirkung auf die Myzelerzeugung. Wurde eines dieser Metalle fortgelassen, so konnte sich die Ernte auf 1/85–1/50 der maximalen vermindern. STEINBERG zog den Schluss, dass Mn notwendig für *Aspergillus niger* ist. Dass die Ausschläge bei den Versuchen für Mn so viel kleiner waren als für Fe und Zn, erklärte er damit, dass es besonders schwierig sei, das erstgenannte Metall vollständig aus einer Nährlösung zu entfernen.

Zu STEINBERGS Darstellung sei Folgendes bemerkt: Er erntete seine Myzelien nach 6 oder in gewissen Fällen nach 7 Tagen. Vollständige Wachstumskurven wurden nicht festgestellt. Unter der Voraussetzung, dass noch keine Autolyse hatte eintreten können, zeigen seine Versuche nur, dass Mn unter den gewählten Versuchsbedingungen die Wachstumsgeschwindigkeit für *Aspergillus* um nahezu 100 % steigert. Lediglich hieraus zu folgern, dass Mn ein für das Wachstum des Pilzes notwendiges Element ist, erscheint mir übereilt. Noch weniger halte ich es für angängig, allein aus der Grösse der genannten Ausschläge Schlüsse hinsichtlich der Effektivität der Reinigungsmethodik bei den verschiedenen Metallen zu ziehen. Ein solches Verfahren würde ja voraussetzen, dass der Pilz, um eine gewisse Wachstumsgeschwindigkeit zu erreichen, nahezu gleich grosse Mengen von jedem der verschiedenen Metalle braucht, eine Annahme, die nicht bewiesen und auch von vornherein nicht wahrscheinlich ist.

Man weiss also, dass die Wachstumsgeschwindigkeit bei *Aspergillus niger* durch Zusatz äusserst geringer Mengen Mn erhöht wird, und dass dieses Metall von grosser Bedeutung für die Konidienbildung des Pilzes ist. Es ist jedoch meiner Ansicht nach noch nicht endgültig bewiesen, dass Mn absolut notwendig für das Wachstum des Pilzes ist.

Der Manganbedarf höherer Pilze ist meines Wissens nicht experimentell untersucht worden.

Bei Untersuchungen über den Einfluss von Metallen auf das Wachstum verschiedener Organismen ist es wünschenswert, dass die Mengen der Metalle, die als Verunreinigungen in den verwendeten Nährlösungen enthalten sind, so genau wie möglich bestimmt werden. Tab. 36 gibt eine Übersicht über den Gehalt der von mir benutzten Chemikalien an Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe und Cu nach spektrographischen Bestimmungen. Gewisse dieser Chemikalien wurden für spezielle Zwecke durch Umkristallisation aus dreimal destilliertem Wasser gereinigt (siehe S. 154). Auch der Gehalt dieser umkristallisierten Chemikalien an den genannten Metallen ist aus Tab. 36 ersichtlich.[1]

Auf Grund der Angaben in Tab. 36 lässt sich die Ca-Menge, die infolge des Ca-Gehalts der Chemikalien in der Nährlösung A enthalten ist, auf ca. 0,005 mMol (0,2 mg) je Liter berechnen.

Tabelle 36.

Gehalt der in den Nährlösungen angewandten Chemikalien an verschiedenen Metallen (mMol je 1000 g).

	Nicht umkristallisiert				Umkristallisiert			
	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg	Ca
NaCl	—	0	0	0,07	—	0	0	0,03
KH_2PO_4	Spuren	—	0	0,02	—	—	—	—
K_2HPO_4	40	—	0	0	—	—	—	—
NH_4Cl	Spuren	0	0	0,14	—	—	—	—
NH_4-Tartrat	»	0	0	0,78	—	—	—	—
$MgSO_4 . 7 H_2O$	»	0	—	2,64	Spuren	0	—	0,20
$CaCl_2$	80	18,5	0	—	—	—	—	—
$CaCl_2 . 6 H_2O$	Spuren	0	0	—	Spuren	0	0	—
$CaSO_4 . 2 H_2O$	»	0	0	—	—	—	—	—
$SrCl_2 . 6 H_2O$	»	0	0	1,08	—	—	—	—
$ZnSO_4 . 7 H_2O$	»	0	0	0,05	Spuren	0	0	0,02
$MnCl_2 . 4 H_2O$	—	—	—	—	»	0	0	0,18
$MnSO_4 . 4 H_2O$	Spuren	0	2,0	3,15	—	—	—	—
$FeCl_3 . 6 H_2O$	»	66,5	0	0	—	—	—	—
Glykose	»	0	0	0	Spuren	0	0	0
Asparagin	»	0	0	0,5	»	0	0	0

0: nicht nachweisbar; —: nicht untersucht.

Mn, Fe und Cu konnten als Verunreinigungen in sämtlichen Proben nicht nachgewiesen werden.

[1] Professor H. Lundegårdh hatte die Freundlichkeit, die Ausführung dieser Bestimmungen am Pflanzenphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule zu gestatten.

a. *Vorversuch.*

In Versuch 25 untersuchte ich den Einfluss von Ca und Mn sowie der salzsäurelöslichen Mineralbestandteile des Espenlaubextrakts auf das Wachstum der übrigen *Marasmius*-Arten.

Versuch 25. Der Einfluss von Kalzium und Mangan sowie der salzsäurelöslichen Mineralbestandteile von Espenlaubextrakt auf das Wachstum der Pilze (Tab. 37).

Nährlösung A mit Zusatz von 0,5 g NaCl und 50 γ Aneurin je Liter.

6 Reihen nach Tab. 37. In den Reihen, in denen sowohl Ca als Mn zugesetzt wurden, war die Konzentration dieser Metalle dieselbe wie in den Reihen, wo sie je für sich zugesetzt wurden. Anfangs-pH 5,5. Jedem der Kolben, die mit *M. androsaceus* geimpft wurden, wurden 10 mγ Biotin zugesetzt. 4 Parallelkolben.

Tabelle 37.

Der Einfluss von Kalzium und Mangan sowie der salzsäurelöslichen Mineralbestandteile von Espenlaubextrakt auf das Wachstum der Pilze (Versuch 25).[1]

Versuchsobjekt	Versuchszeit in Tagen	Myzel-Trockengewicht in mg					
		Kein Zusatz	200 mg $CaCl_2.6H_2O$ je Liter	10 mg $MnSO_4.4H_2O$ je Liter	Ca + Mn	10 ccm Asche-Lösung je Liter	Ca + Mn + Asche
M. alliaceus . .	15	0,8 ± 0,1	3,2 ± 0,4	1,6 ± 0,1	6,7 ± 0,6	5,7 ± 0,5	6,5 ± 0,4
M. androsaceus C	20	7,8 ± 0,5	14,8 ± 1,2	5,9 ± 0,3	15,6 ± 0,7	14,0 ± 0,2	15,3 ± 0,8
M. chordalis . .	15	0,5 ± 0,0	7,8 ± 0,4	0,4 ± 0,0	7,8 ± 0,8	3,7 ± 0,1	8,4 ± 0,4
M. epiphyllus .	15	1,8 ± 0,7	17,1 ± 2,5	2,8 ± 0,4	9,5 ± 1,3	3,6 ± 1,0	14,0 ± 0,9
M. foetidus A .	15	9,8 ± 0,4	11,3 ± 0,3	10,9 ± 0,3	10,2 ± 0,7	10,4 ± 0,7	10,6 ± 0,2
M. fulvobulb. B.	25	1,8 ± 0,2	4,6 ± 0,4	3,3 ± 0,4	5,5 ± 0,2	3,8 ± 0,4	6,2 ± 0,3
M. graminum .	12	22,3 ± 1,7	72,6 ± 0,8	29,4 ± 2,2	79,6 ± 3,1	68,5 ± 0,7	65,8 ± 2,0
M. perforans A	20	2,0 ± 0,1	3,2 ± 0,4	11,7 ± 0,4	5,6 ± 0,9	4,9 ± 0,7	8,9 ± 2,2
M. peronatus A	15	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	5,3 ± 0,5	4,1 ± 0,3	9,0 ± 0,8
M. putillus . .	25	3,2 ± 0,3	6,1 ± 0,5	4,9 ± 0,4	11,3 ± 0,7	8,7 ± 0,5	13,6 ± 0,4
M. ramealis C .	15	1,9 ± 0,2	3,7 ± 0,2	2,2 ± 0,1	5,7 ± 0,4	6,3 ± 0,4	6,0 ± 0,4
M. scorodonius A	15	2,9 ± 0,3	11,5 ± 0,4	8,4 ± 0,6	22,2 ± 2,5	17,5 ± 2,0	27,2 ± 0,7

Dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze in der Regel durch Zusatz der Aschenbestandteile von Espenlaubextrakt gesteigert wird, wurde durch Versuch 25 bestätigt. *M. foetidus* machte jedoch bei diesem wie bei Versuch 23 eine Ausnahme. Die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Art wurde auch nicht merklich durch einen Zusatz von Ca oder Mn beeinflusst.

[1] End-pH in den Kontrollreihen 4,6—5,5, in der Ca-Reihe bei *M. androsaceus* 4,2 und bei den übrigen Arten 4,5—5,5.

Was die Wirkung dieser Metalle und der Asche des Espenlaubextrakts auf die übrigen Arten betrifft, möchte ich zunächst auf die interessante Tatsache hinweisen, dass die Mehrzahl der Arten nicht auf einen Zusatz der Asche reagierte, wenn die Nährlösung mit Ca und Mn versetzt worden war. Dies gilt von *M. alliaceus*, *M. androsaceus*, *M. chordalis*, *M. fulvobulbillosus*, *M. graminum*, *M. putillus* und *M. ramealis*. Gewisse Arten, nämlich *M. epiphyllus*, *M. perforans*, *M. peronatus* und *M. scorodonius*, zeigten jedoch eine gewisse Tendenz zu erhöhter Wachstumsgeschwindigkeit, wenn die Nährlösung ausser Ca und Mn auch Asche-Lösung enthielt.

Die Resultate der Versuche 24 und 25 müssen so gedeutet werden, dass die Metalle Ca und Mn höchstwahrscheinlich zu den Substanzen der Asche des Espenlaubextrakts gehören, die das Wachstum der *Marasmius*-Arten am stärksten beeinflussen.

In ihrem Verhalten zu diesen beiden Metallen zeigten die verschiedenen Arten indes grosse Unterschiede. *M. androsaceus*, *M. chordalis*, *M. epiphyllus*, *M. fulvobulbillosus* und *M. graminum* erreichten praktisch maximale Wachstumsgeschwindigkeit, wenn nur Ca zugesetzt wurde. Ein Zusatz von Mn hatte keine oder bloss schwache Wirkung bei diesen Arten. *M. alliaceus*, *M. peronatus*, *M. putillus*, *M. ramealis* und *M. scorodonius* wuchsen dagegen bei Zusatz beider Metalle deutlich rascher, als wenn nur eines der Metalle zugesetzt wurde. *M. perforans* nimmt durch seine kräftige Reaktion auf Mn allein eine Sonderstellung ein.

b. *Die Wirkung von Kalzium und Mangan in verschiedenen Konzentrationen.*

Die bei den Versuchen 24 und 25 verwendeten Ca- und Mn-Konzentrationen wurden mit Rücksicht auf Angaben in der Literatur über den Effekt dieser Metalle auf verschiedene Organismen gewählt. Ob diese Konzentrationen unter den herrschenden Versuchsbedingungen optimal für die *Marasmius*-Arten waren, geht aus den Resultaten nicht hervor. Um diese Frage näher zu studieren, wurden die Versuche 26 und 27 ausgeführt. Bei diesen wurde sowohl die Ca- als die Mn-Konzentration variiert. Als Objekt diente teils der speziell für Mn empfindliche *M. perforans*, teils der für Ca empfindliche *M. epiphyllus*, teils endlich *M. alliaceus* und *M. rotula*, welche Arten kräftige Reaktion auf beide Metalle gezeigt hatten.

Versuch 26. Der Einfluss verschiedener Kalzium- und Manganmengen auf das Wachstum von Marasmius perforans A (Tab. 38, Fig. 16).

Nährlösung A mit Zusatz von 0,5 g NaCl und 50 γ Aneurin je Liter. Zweimal destilliertes Wasser.

Der Versuch umfasste 16 Reihen, die in allen möglichen Kombinationen 0, 1, 10 und 100 mg $CaSO_4 . 2\,H_2O$ bzw. 0, 0,5, 5 und 50 mg $MnSO_4 . 4\,H_2O$ je Liter enthielten. Um den Vergleich zwischen den Wirkungsgraden der beiden Metalle zu erleichtern, habe ich in der Tabelle die Konzentrationen der Metalle in mMol je Liter angegeben. 6 Parallelkolben.

Tabelle 38.

Der Einfluss verschiedener Kalzium- und Manganmengen auf das Wachstum von *Marasmius perforans* A (Versuch 26).

Myzel-Trockengewicht (mg) nach 38 Tagen.

		mMol Ca je Liter			
		0	0,0058	0,058	0,58
mMol Mn je Liter	0	12,4 ± 0,8	15,1 ± 0,8	16,8 ± 1,3	25,8 ± 3,4
	0,0022	60,5 ± 4,7	62,3 ± 5,8	39,1 ± 2,1	43,2 ± 5,3
	0,022	68,1 ± 7,4	75,1 ± 4,6	67,1 ± 3,3	54,6 ± 6,1
	0,22	53,1 ± 5,1	67,3 ± 6,5	62,6 ± 6,9	61,2 ± 8,3

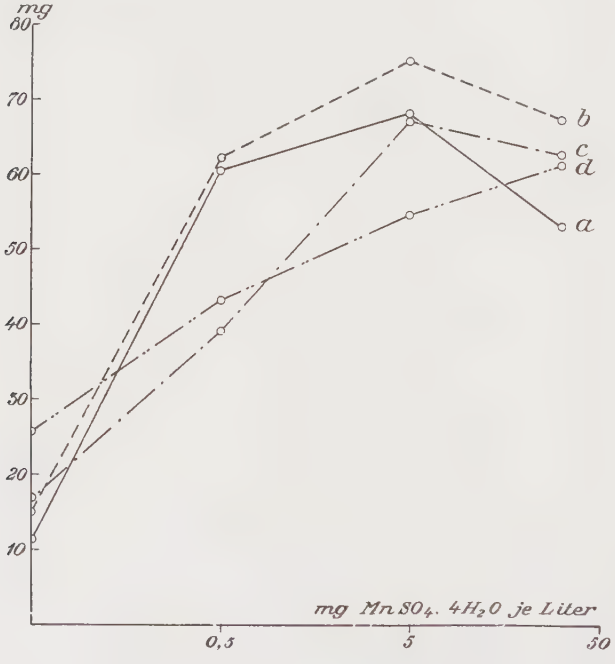

Fig. 16. Der Einfluss verschiedener Kalzium- und Manganmengen auf das Wachstum von *Marasmius perforans* A. *a*: kein Ca-Zusatz; *b*, *c* und *d*: 0,0058, 0,058 bzw. 0,58 mMol Ca je Liter (Versuch 26).

Versuch 27. Der Einfluss verschiedener Kalzium- und Manganmengen auf das Wachstum von Marasmius alliaceus, M. epiphyllus und M. rotula C (Tab. 39, Fig. 17–19).

Nährlösung A mit Zusatz von 0,5 g NaCl und 50 γ Aneurin je Liter. Zweimal destilliertes Wasser.

Ca wurde bei diesem Versuch als $CaCl_2 . 6H_2O$, Mn als $MnCl_2 . 4H_2O$ zugesetzt. Beide Salze wurden vor der Anwendung in dreimal destilliertem Wasser umkristallisiert. Der Versuch umfasste 20 Reihen, die in allen möglichen Kombinationen 0, 0,005, 0,05 und 0,5 mMol Ca bzw. 0, 0,0005, 0,005, 0,05 und 0,5 mMol Mn je Liter Nährlösung enthielten. 6 Parallelkolben.[1]

Tabelle 39.

Der Einfluss verschiedener Kalzium- und Manganmengen auf das Wachstum einiger *Marasmius*-Arten (Versuch 27).

		mMol Ca je Liter			
		0	0,005	0,05	0,5
		a) *Marasmius alliaceus.* Myzel-Trockengewicht (mg) nach 25 Tagen.			
mMol Mn je Liter	0	3,0 ± 0,2	4,9 ± 0,3	19,3 ± 1,8	12,2 ± 1,5
	0,0005	4,6 ± 0,3	7,7 ± 0,5	21,9 ± 1,9	9,5 ± 1,0
	0,005	5,8 ± 0,3	8,3 ± 0,4	22,8 ± 0,8	10,5 ± 0,7
	0,05	6,2 ± 0,2	8,1 ± 0,3	25,5 ± 2,1	10,3 ± 0,3
	0,5	6,4 ± 0,4	11,7 ± 0,9	28,1 ± 1,4	17,9 ± 1,7
		b) *Marasmius epiphyllus.* Myzel-Trockengewicht (mg) nach 20 Tagen.			
mMol Mn je Liter	0	10,1 ± 0,9	19,8 ± 1,9	33,0 ± 1,6	73,5 ± 3,6
	0,0005	11,1 ± 0,8	18,0 ± 1,7	38,4 ± 1,5	83,8 ± 3,5
	0,005	10,7 ± 1,2	18,3 ± 2,4	35,7 ± 1,6	78,5 ± 3,2
	0,05	18,2 ± 1,4	20,8 ± 1,0	47,6 ± 1,7	77,0 ± 3,8
	0,5	20,3 ± 1,2	35,8 ± 2,3	48,6 ± 3,3	52,6 ± 1,3
		c) *Marasmius rotula* C. Myzel-Trockengewicht (mg) nach 20 Tagen.			
mMol Mn je Liter	0	3,4 ± 0,3	3,2 ± 0,5	10,9 ± 2,0	24,6 ± 1,7
	0,0005	6,1 ± 1,9	8,3 ± 0,9	22,2 ± 3,0	36,0 ± 4,5
	0,005	5,3 ± 1,2	12,6 ± 2,3	29,6 ± 6,2	38,5 ± 3,1
	0,05	4,2 ± 0,7	11,2 ± 1,8	23,9 ± 2,9	36,9 ± 3,3
	0,5	9,1 ± 0,9	12,1 ± 1,3	22,5 ± 2,2	35,0 ± 3,3

[1] Ausserdem wurden anfangs eine Anzahl Versuchsreihen mit einer Ca-Konzentration von 5 mMol je Liter angesetzt. In diesen Reihen fielen allmählich schwer lösliche Kristalle

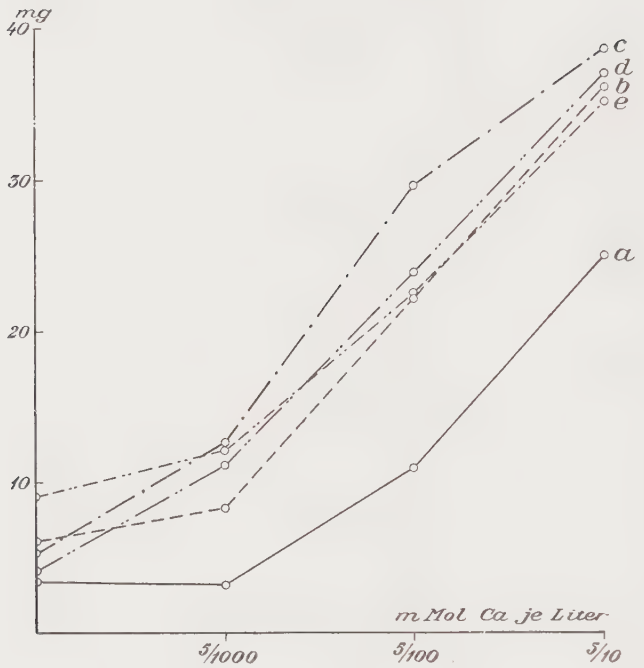

Fig. 17. Der Einfluss verschiedener Kalzium- und Manganmengen auf das Wachstum von *Marasmius rotula* C. *a*: kein Mn-Zusatz; *b*, *c*, *d* und *e*: 0,0005, 0,005, 0,05 bzw. 0,5 mMol Mn je Liter (Versuch 27).

M. perforans reagierte auch bei Versuch 26 ausserordentlich stark auf einen Zusatz von Mn. Schon in der Konzentration 0,0022 mMol (0,123 mg) je Liter übte dieses Metall maximale Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes aus, die durch diesen Zusatz verfünffacht wurde. Ein gewisser wachstumsfördernder Effekt von Ca konnte nur in der Reihe konstatiert werden, die dieses Metall in der Konzentration 0,58 mMol je Liter enthielt, aber keinen Mn-Zusatz erhalten hatte.

Auch bei *M. rotula* (Versuch 27) wurde die Wachstumsgeschwindigkeit durch Mn-Zusatz gesteigert, wenn auch nicht in so hohem Grade wie bei *M. perforans*. Bei einem Zusatz von 0,0005 mMol (0,027 mg) Mn je Liter bildete der Pilz in den Reihen mit den schwächeren Ca-Konzentrationen während der Dauer des Versuchs ungefähr doppelt so viel Myzel wie in entsprechenden Reihen ohne Mn-Zusatz. In der Reihe, die mit 0,5 mMol Ca je Liter versetzt wurde, war die durch den eben erwähnten Mn-Zusatz

von Ca-Tartrat aus, an denen die Pilzmyzelien festwuchsen, und die am Ende der Versuche kaum von den Myzelien getrennt werden konnten. Zuverlässige Werte für die Myzeltrockengewichte konnten für diese Reihen nicht erhalten werden, die deshalb kassiert wurden.

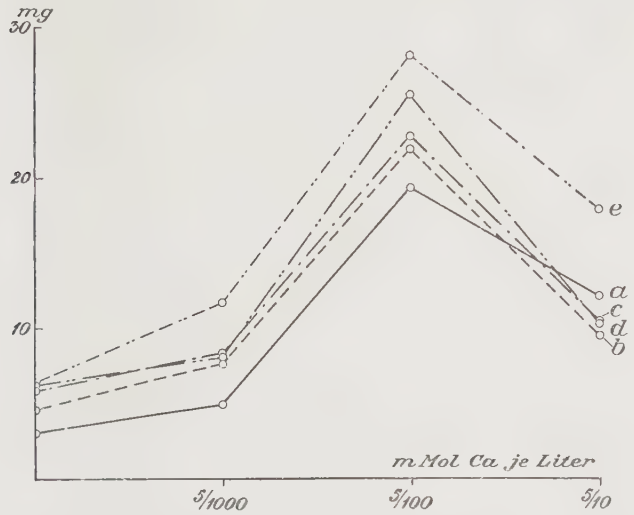

Fig. 18. Der Einfluss verschiedener Kalzium- und Manganmengen auf das Wachstum von *Marasmius alliaceus*. Bezeichnungen wie bei Fig. 17 (Versuch 27).

verursachte Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit relativ etwas geringer, was möglicherweise darauf beruhte, dass das Wachstum hier so weit ging, dass andere Faktoren als Metalle begrenzend auf dasselbe wirkten. Eine weitere Erhöhung der Mn-Konzentration bewirkte keine sicher feststellbare Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit.

Der Effekt von Ca war sehr deutlich, und der Pilz reagierte auf dieses Metall stärker als auf Mn. Maximale Ca-Wirkung wurde erst bei einer Konzentration von 0,5 mMol je Liter erreicht. Ob eine weitere Erhöhung der Ca-Konzentration die Wachstumsgeschwindigkeit noch mehr gesteigert hätte, lässt sich nach diesem Versuch nicht entscheiden.

Der Effekt, den Ca und Mn zusammen hatten, war grösser als die Summe der Effekte, die jedes der beiden Metalle für sich ausübte.

M. alliaceus bildete bei verschiedenen Ca-Konzentrationen verschiedene Myzeltypen (vgl. S. 84). Ohne Ca-Zusatz oder in Anwesenheit von nur 0,005 oder 0,05 mMol Ca je Liter bildete der Pilz unbedeutende Mengen Luftmyzel, und das submerse Myzel war stark schleimbildend. Bei 0,5 mMol Ca je Liter war dagegen die Luftmyzelbildung reichlich und das submerse Myzel wenig schleimig. Infolgedessen waren die Trockengewichtsziffern am höchsten in der Reihe mit 0,05 mMol Ca je Liter. Hieraus darf man indes nicht schliessen, dass dies die optimale Ca-Konzentration für den Pilz ist. Die Trockengewichtsziffern für die Reihen mit der höchsten Ca-Konzentration können streng genommen nicht mit den Zif-

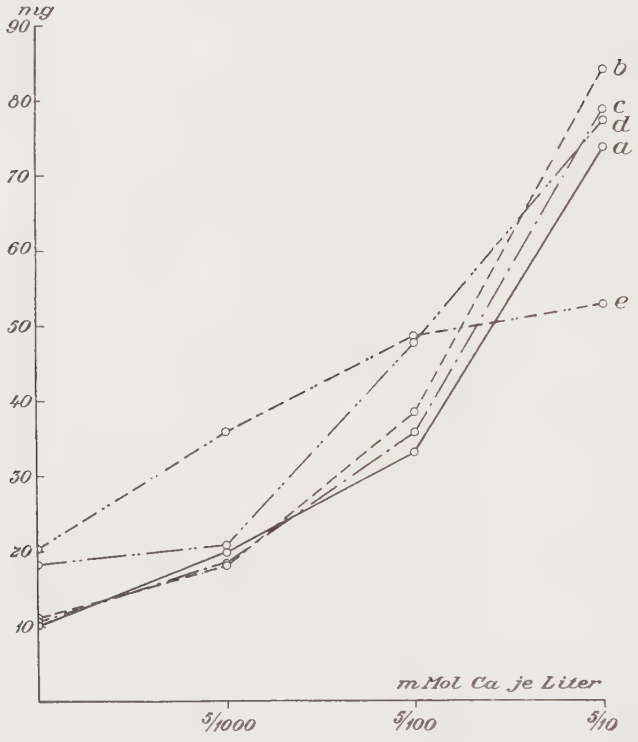

Fig. 19. Der Einfluss verschiedener Kalzium- und Manganmengen auf das Wachstum von *Marasmius epiphyllus*. Bezeichnungen wie bei Fig. 17 (Versuch 27).

fern für die übrigen Serien verglichen werden. Es ist indes deutlich, dass Ca unter den herrschenden Versuchsbedingungen von grösster Bedeutung für *M. alliaceus* ist.

Auch bei Mn-Zusatz nahm die Wachstumsgeschwindigkeit für diesen Pilz zu. Der Mn-Effekt war jedoch abhängig von der Ca-Konzentration. In den Reihen mit den beiden schwächsten Ca-Konzentrationen hatte schon ein Zusatz von 0,0005 mMol Mn je Liter deutliche Wirkung. Durch weitere Erhöhung der Mn-Konzentration wurde der Effekt etwas gesteigert. In den Reihen, welche grössere Mengen Ca enthielten, hatte Mn erst in stärkerer Konzentration deutlichen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes.

Unter den vier Pilzen, die bei den Versuchen 26 und 27 untersucht wurden, war *M. epiphyllus* die Art, welche am stärksten auf einen Zusatz von Ca reagierte. Schon ein Zusatz von 0,005 mMol Ca je Liter verdoppelte die Wachstumsgeschwindigkeit. Das stärkste Wachstum wurde bei 0,5 mMol Ca je Liter erzielt. Auch in diesem Fall lässt sich indes nicht

sagen, ob eine weitere Erhöhung der Ca-Konzentration die Wachstumsgeschwindigkeit noch mehr gesteigert haben würde.

Der Pilz schien weniger empfindlich für Mn zu sein als die übrigen Arten. Erst in der Konzentration 0,05 mMol je Liter hatte dieses Metall deutliche Wirkung.

Es ist wahrscheinlich, dass sich die Produktion in den 5 Reihen mit der höchsten Ca-Konzentration dem Maximum näherte, und dass andere Faktoren als die Metalle hier in erster Linie die Wachstumsgeschwindigkeit begrenzten. Der relativ niedrige Wert des Myzeltrockengewichts in der Reihe mit der höchsten Ca- und Mn-Konzentration erscheint jedoch sehr schwer erklärbar.

Gewisse Werte in Tab. 38 könnten möglicherweise zu der Vermutung Anlass geben, dass bei dem Versuch mit *M. perforans* eine antagonistische Wirkung von Ca und Mn bestand. Ein solcher Antagonismus müsste jedoch bei diesem Mn-fordernden Pilz in erster Linie eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit bewirkt haben, wenn der Nährlösung steigende Mengen Ca zugesetzt wurden, ohne dass dieselbe einen Mn-Zusatz erhielt. Dies war nicht der Fall. Im Gegenteil lag der Wert des Myzeltrockengewichts in der „Mn-freien" Reihe mit dem höchsten Ca-Gehalt deutlich höher als in der entsprechenden Reihe ohne Ca. Die in Tab. 39 zusammengestellten Resultate deuten auch nicht auf einen ausgesprochenen Antagonismus zwischen Ca und Mn bei den übrigen näher untersuchten Arten.

Durch die Versuche 26 und 27 wurde die bei Versuch 25 gemachte Beobachtung bestätigt, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen gewisse *Marasmius*-Arten besonders stark auf einen Zusatz von Ca, andere auf einen von Mn reagieren. Es ist indes darauf hinzuweisen, dass diese beiden Gruppen nicht als zwei entgegengesetzte physiologische Typen unter den Pilzen aufgefasst werden können. Dass das Verhalten der Pilze zu Ca und Mn hier gleichzeitig untersucht wurde, beruht ja lediglich darauf, dass diese Metalle wahrscheinlich beide physiologisch bedeutsame Bestandteile von Streuextrakt sind.

Es muss von vornherein als wahrscheinlich angesehen werden, dass Ca und Mn in getrennte physiologische Prozesse eingreifen. Dass die maximale Wirkung der beiden Metalle bei verschiedenen Konzentrationen eintritt und dass kein deutlicher Antagonismus zwischen ihnen zu herrschen scheint, steht gut im Einklang mit dieser Annahme.

Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Mn habe ich nicht vorgenommen. Katalytische Wirkungen dieses Metalls sind indes wohlbekannt (Literaturangaben bei Pirschle 1939), und es ist möglich, dass

die Mn-Wirkung bei den Pilzen auf solchen Wirkungen beruht (vgl. auch Versuch 12, S. 66).

Über die Ursachen der Ca-Wirkung habe ich eingehendere Untersuchungen angestellt, über die im folgenden berichtet wird.

c. *Die Wirkungsweise des Kalziums.*

Lösungen einzelner Nährsalze üben gewöhnlich eine Giftwirkung auf Zellen und Gewebe aus (Osterhout 1906, 1907 u. a.). Die Ursache hiervon ist, dass aus reinen Salzlösungen relativ grosse Mengen des Kations aufgenommen werden, und dass eine Überschwemmung des Protoplasmas mit ein und demselben Kation schädliche Wirkungen hat. In einer Lösung von zwei oder mehreren Salzen hemmen die Ionen gegenseitig ihre Aufnahme. Dieser wechselseitige Einfluss der Ionen aufeinander wird gewöhnlich Antagonismus genannt. Eine Darstellung, wie man sich die Entstehung des Ionenantagonismus bei der Salzaufnahme des Protoplasmas denken kann, gibt Lundegårdh (1932, siehe auch 1940).

Wenn es sich darum handelt, die günstige Wirkung von Ca auf das Wachstum von Pilzen zu erklären, sind besonders folgende Tatsachen zu beachten. Ca wird stark von der Oberflächenschicht des Protoplasmas adsorbiert. Dabei können andere Ionen in grossem Umfang verdrängt werden. Durch die Adsorption von Ca vermindert sich auch die Quellung und Permeabilität des Plasmas. Dass Ca bei höheren Pflanzen antagonistisch gegenüber K, Na, Mg und Mn u. a. wirkt, ist durch Kultur- und Plasmolyseversuche von verschiedenen älteren Forschern nachgewiesen worden (Literaturangaben bei Rubinstein 1928 und Lundegårdh 1932). Mit exakteren Methoden haben Lundegårdh (1932, 1940) und Burström (1934) dasselbe festgestellt.

Es dürfte hier am Platze sein, etwas auf den Begriff Ionenantagonismus einzugehen. Rubinstein definiert Antagonismus folgendermassen: „Als Antagonismus bezeichnen wir dann einfach eine symbathe Abhängigkeit zwischen den Konzentrationen von zwei Ionen. Wir sagen also, dass sie antagonistisch auf eine Lebenserscheinung einwirken, wenn der Einfluss irgend einer Konzentrationsveränderung des einen Ions auf dieselbe durch eine gleichsinnige Veränderung des anderen äquilibriert und ausgeglichen wird" (Rubinstein 1928, S. 261; Burström 1934, S. 159). Burström (l. c., S. 160) gebraucht den Ausdruck Antagonismus, um zu bezeichnen, dass ein Ion die Geschwindigkeit vermindert, mit der ein anderes gleichnamig geladenes Ion von den Wurzeln aus einer Nährlösung aufgenommen wird.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde der Zusammenhang zwi-

schen dem Gehalt der Nährlösung an verschiedenen Ionen und der Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze studiert. Wenn zwei Ionen dem beiderseitigen Einfluss auf einen so komplizierten biologischen Prozess wie das Wachstum entgegenwirken, können sie ganz verschiedene Angriffspunkte in der Zelle haben (vgl. Burström l. c.). Solchenfalls liegt kein echter physiologischer Ionenantagonismus vor. Rubinstein (1928, S. 305) bezeichnet eine solche Erscheinung als „Pseudoantagonismus". Mehrere Autoren, an deren Arbeiten die folgende Erörterung anknüpft, wenden indes den Ausdruck Antagonismus in Rubinsteins ersterwähntem weiten Sinne an. Da es aus praktischen Gründen wertvoll ist, mit einem Wort die Tatsache bezeichnen zu können, dass ein Ion den entweder günstigen oder hemmenden Effekt eines andern Ions auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze vermindert, habe auch ich hier den Ausdruck Antagonismus in seinem weiten Sinne gebraucht.

Die Abhängigkeit der Kalziumwirkung von der Magnesiumsulfatkonzentration.

Rippel & Stoess (1932) fanden, wie oben erwähnt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit bei einer Anzahl Bakterien und niederen Pilzen zunahm, wenn die Nährlösung mit Ca versetzt wurde. Sie nahmen an, dass dieser Ca-Effekt auf einer antagonistischen Wirkung von Ca gegen Mg beruhte. Um diese Annahme nachzuprüfen, stellten sie Versuche an, bei denen die Mg- und Ca-Konzentrationen variiert wurden. Bei sehr hoher Mg-Konzentration war eine gewisse Schutzwirkung von Ca gegen Mg nachweisbar. Beweise dafür, dass die Ca-Wirkung auch in den Nährlösungen mit normaler Mg-Konzentration durch den Antagonismus zwischen Ca und Mg bedingt war, haben diese Autoren jedoch meiner Ansicht nach nicht geliefert. Mann (1932) und Rennerfelt (1934), welche mit *Aspergillus niger* arbeiteten, konnten nicht nachweisen, dass Ca antagonistisch gegen Mg wirkte. Ebensowenig fand Ledeboer (1934) bei ihren Untersuchungen über *Ceratostomella ulmi* eine antagonistische Wirkung zwischen Ca und Mg.

Wäre der Effekt von Ca auf das Wachstum der *Marasmius*-Arten eine Folge des Antagonismus zwischen Ca und Mg, so müsste dies ja in sich schliessen, dass die Mg-Konzentration der benutzten Nährlösung supraoptimal war und auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes eine gewisse hemmende Wirkung ausübte, der von Ca entgegengewirkt wurde. Um zu prüfen, ob dies der Fall war, stellte ich Versuch 28 an. Als Versuchsobjekt wählte ich *M. rotula*, der ja in den Versuchen 24 und 27 sehr stark auf einen Zusatz von Ca reagiert hatte.

Versuch 28. Der Einfluss verschiedener Magnesium- und Kalziumkonzentrationen auf das Wachstum von Marasmius rotula C (Tab. 40, Fig. 20).

Grundlösung: Nährlösung A mit Zusatz von 5 mg $MnSO_4 . 4 H_2O$ und 50 γ Aneurin je Liter, aber ohne Mg-Sulfat. Zweimal destilliertes Wasser. 24 Reihen nach Tab. 40. 6 Parallelkolben.

Der Einfluss der Mg-Sulfatkonzentration auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes war in hohem Grade von der gleichzeitig vorhandenen Ca-Menge abhängig.

In den Reihen ohne Mg-Sulfat zeigte der Pilz keine oder (bei der grössten Ca-Sulfatmenge) ganz geringe Entwicklung.

Wenn kein Ca zugesetzt wurde, wurden bei einem Mg-Sulfatgehalt von 20 mg je Liter nach 15 Tagen ca. 2 mg Myzel erhalten. Eine Vermehrung des Mg-Sulfatgehalts auf 100 oder 500 mg je Liter hatte keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Bei einem Zusatz von 2 500 bzw. 12 500 mg je Liter nahm indes die Wachstumsgeschwindigkeit weiterhin zu.

In den Reihen mit 1 mg Ca-Sulfat je Liter war die Wachstumsgeschwindigkeit etwas grösser als in den entsprechenden Reihen ohne Ca, aber der Pilz reagierte auf die verschiedenen Mg-Sulfatkonzentrationen in derselben Weise. Bei einer Mg-Sulfatkonzentration von 20 bis 500 mg je Liter wurden ca. 4 mg Myzel erhalten. Weitere Erhöhung der Konzentration dieses Salzes bewirkte gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit.

Wenn die Lösung 10 mg Ca-Sulfat je Liter enthielt, führte eine Erhöhung der Mg-Sulfatkonzentration von 0 auf 500 mg je Liter eine starke Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit herbei. Eine weitere Steigerung der Mg-Sulfatkonzentration bewirkte dagegen nur eine ziemlich geringe Beschleunigung des Wachstums.

Bei einer Ca-Sulfatkonzentration von 100 mg je Liter endlich stieg die Wachstumsgeschwindigkeit sehr stark, wenn die Mg-Sulfatkonzentration von 0 auf 100 mg je Liter erhöht wurde. Eine Erhöhung der Mg-Sulfatkonzentration auf 500 mg je Liter und darüber hatte bei dieser Ca-Konzentration keinen Effekt.

Aus dem Versuch geht hervor, dass die in den Nährlösungen allgemein verwendete Mg-Sulfatkonzentration, 500 mg je Liter, in der Reihe ohne Ca-Zusatz mehr als ausreichend hoch war, damit sich der Pilz unter den gewählten Versuchsbedingungen mit maximaler Geschwindigkeit entwikkeln konnte. (Hier wird einstweilen von dem Effekt der beiden stärksten Mg-Sulfatkonzentrationen abgesehen, vgl. unten.) Eine hemmende Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes übte das Mg-Sulfat weder in dieser noch in den höheren Konzentrationen aus. Ein Zusatz von Ca bewirkte bei sämtlichen Mg-Sulfatkonzentrationen, auch der schwächsten (20 mg je Liter), eine starke Zunahme der Wachstumsge-

Tabelle 40.

Der Einfluss verschiedener Magnesium- und Kalziumkonzentrationen auf das Wachstum von *Marasmius rotula* C (Versuch 28).

Myzel-Trockengewicht (mg) nach 15 Tagen.

$MgSO_4 . 7 H_2O$ mg je Liter	mg $CaSO_4 . 2 H_2O$ je Liter			
	0	1	10	100
0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,1 ± 0,1
20	2,0 ± 0,2	3,8 ± 0,5	3,6 ± 0,3	9,0 ± 0,6
100	2,2 ± 0,2	3,3 ± 0,5	8,2 ± 2,5	20,3 ± 1,1
500	2,2 ± 0,3	4,6 ± 0,4	12,9 ± 1,2	22,0 ± 1,7
2500	4,0 ± 0,4	6,4 ± 1,2	16,1 ± 1,2	17,1 ± 1,8
12500	11,5 ± 0,5	12,7 ± 2,4	18,6 ± 2,2	20,4 ± 1,3

End-pH: 4,7–5,5.

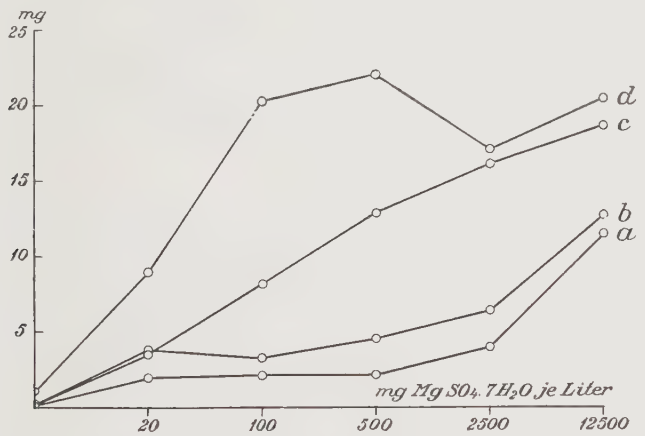

Fig. 20. Der Einfluss verschiedener Magnesium- und Kalziummengen auf das Wachstum von *Marasmius rotula* C. *a*: kein Ca-Zusatz; *b*, *c* und *d*: 1, 10 bzw. 100 mg $CaSO_4 . 2 H_2O$ je Liter (Versuch 28).

schwindigkeit. Eine antagonistische Wirkung von Ca gegen Mg war also nicht feststellbar.

Der günstige Effekt, den die beiden stärksten Mg-Sulfatkonzentrationen in den Reihen mit 0 bzw. 1 mg Ca-Sulfat je Liter hatten, muss entweder darauf beruhen, dass das Mg-Sulfat bei diesen Konzentrationen an sich selbst eine günstige Wirkung hatte, die bei schwächeren Konzentrationen nicht hervortrat, oder darauf, dass das Salz günstig wirkende Ver-

unreinigungen enthielt, die erst in diesen Reihen solche Konzentrationen erlangten, dass ihr Effekt bemerkbar wurde.

In einem Versuch, der hier in aller Kürze erwähnt sei, verglich ich die Wirkung verschiedener Konzentrationen des bei Versuch 28 verwendeten Mg-Sulfats und desselben Salzes, umkristallisiert in dreimal destilliertem Wasser, auf *M. rotula*. In Konzentrationen von 4 bis 500 mg je Liter waren die beiden Mg-Sulfate gleichwertig. Bei den Konzentrationen 2 500 und 12 500 mg je Liter zeigte sich indes ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Salzen. Das nicht umkristallisierte Salz bewirkte wie in Versuch 28 eine erhebliche Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit. Dagegen hatte das umkristallisierte Salz bei der Konzentration 2 500 mg je Liter dieselbe Wirkung wie bei den schwächeren Konzentrationen. Erst wenn das Salz in der Konzentration 12 500 mg je Liter zugesetzt wurde, hatte es einen gewissen fördernden Einfluss auf das Wachstum.

Der Versuch zeigte, dass der wachstumsfördernde Effekt, den das gewöhnliche „analysenreine" Mg-Sulfat bei höherer Konzentration hatte, wesentlich auf gewissen Verunreinigungen des Salzes beruhte, die grossenteils durch einfache Umkristallisation entfernt werden konnten. Aus Tab. 36 (S. 123) geht hervor, dass das nicht umkristallisierte Mg-Sulfat eine nicht unbedeutende Menge Ca enthielt. Dies spricht dafür, dass die wirksame Verunreinigung in diesem Metall bestand.

Die Abhängigkeit der Kalziumwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Ursache des Ca-Effekts muss eine andere sein als die antagonistische Wirkung des Ca gegen Mg. Eine nähere Prüfung der Resultate von Versuch 24 und 25 schien mir einen Fingerzeig zu geben, wie die Untersuchungen über diesen Effekt fortzusetzen seien.

Auf S. 137 sind die numerischen Ausdrücke für das Verhältnis zwischen den Myzelmengen angegeben, die in den ebenerwähnten Versuchen einerseits in der Ca-Reihe, andererseits in der Kontrollreihe gebildet wurden. Die Pilze sind nach der Grösse der so erhaltenen Quotienten aufgeführt. Zum Vergleich hiermit ist die Reihe wiedergegeben, in der die Pilze, wie ich früher gezeigt habe, nach der Lage des pH-Optimums angeordnet werden können.

Die unten angegebenen Quotienten sind natürlich nicht als Konstanten zu betrachten. Bei einer Wiederholung des Versuchs würde sich sicher zeigen, dass sie innerhalb gewisser Grenzen variieren. Dabei würde sich wahrscheinlich auch die Reihenfolge in gewissem Grade verändern. Ebensowenig kann die Reihenfolge, in der die Pilze nach der Lage der pH-

Optima angeordnet sind, als absolut sichergestellt angesehen werden. Im grossen und ganzen dürften indes die beiden Reihen die Empfindlichkeit der Pilze gegen einen Zusatz von Ca bzw. gegen eine Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration in den Nährlösungen zum Ausdruck bringen.

Die *Marasmius*-Arten, nach abnehmender Ca-Reaktion geordnet:		Die *Marasmius*-Arten, nach abnehmender Säure-Empfindlichkeit geordnet:
M. chordalis	(15,60)	*M. graminum*
M. rotula	(10,80)	*M. rotula*
M. epiphyllus	(9,50)	*M. epiphyllus*
M. alliaceus	(4,00)	*M. chordalis*
M. scorodonius	(3,97)	*M. alliaceus*
M. graminum	(3,26)	*M. fulvobulbillosus*
M. fulvobulbillosus	(2,56)	*M. peronatus*
M. ramealis	(1,95)	*M. scorodonius*
M. putillus	(1,91)	*M. ramealis*
M. androsaceus	(1,90)	*M. putillus*
M. perforans	(1,60)	*M. perforans*
M. peronatus	(1,36)	*M. androsaceus*
M. foetidus	(1,15)	*M. foetidus*

Die Übereinstimmung zwischen den beiden Reihen ist eine ziemlich gute. Die Arten, die sich bei den pH-Untersuchungen am empfindlichsten gegen höhere Wasserstoffionenkonzentrationen erwiesen hatten, reagierten nämlich bei Züchtung in Nährlösung A am stärksten auf einen Zusatz von Ca. Dies scheint zu zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der wohlbekannten antagonistischen Wirkung von Ca gegen Wasserstoffionen und seinem Einfluss auf das Wachstum der Pilze besteht.

Brenner (1920) und Prianischnikow (1923) fanden, dass Ca-Ionen die Giftwirkung der Wasserstoffionen auf Zellen verschiedener höherer Pflanzen herabsetzen. Mevius (1927) stellte fest, dass Ca die Widerstandskraft der Wurzeln verschiedener Pflanzen gegen höhere Wasserstoffionenkonzentrationen steigert.

Auch bei niederen Pflanzen ist die antagonistische Wirkung von Ca gegen Wasserstoffionen konstatiert worden. Lundegårdh (1924) wies nach, dass das pH-Optimum für *Gibberella Saubinetii*, einen Parasitenpilz des Weizens, durch Zusatz von Ca nach der sauren Seite verschoben werden kann. Tamiya (1928, S. 96, 99) fand, dass Ca bei *Aspergillus oryzae* eine gewisse Schutzwirkung gegen hohe Wasserstoffionenkonzentrationen ausübt. Waris (1939) stellte die hemmende Wirkung von u. a. Ca

gegen die Wasserstoffionen bei der Desmidiazee *Micrasterias Thomasiana* fest.

Um die Abhängigkeit des Ca-Effekts von der Wasserstoffionenkonzentration zu studieren, beschloss ich, gewisse der *Marasmius*-Arten, die am stärksten auf Ca reagierten, bei einer Reihe verschiedener pH-Werte mit und ohne Zusatz von Ca zu züchten.

In Versuch 29 wurde das Wachstum von *M. graminum* in einer Nährlösung untersucht, deren pH durch Phosphatpuffer auf verschiedene Werte gebracht wurde, und die Ca teils enthielt, teils nicht enthielt.

Versuch 29. Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum von Marasmius graminum bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, die mit Phosphatpuffer hergestellt wurden (Tab. 41).

Grundlösung: siehe Versuch 22, S. 108.

Der Versuch wurde gleichzeitig mit Versuch 22 ausgeführt, und die Ca-Reihen sind identisch mit den *M. graminum*-Reihen in jenem Versuch. 6 Parallelkolben.

Tabelle 41.

Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum von *Marasmius graminum* bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, die mit Phosphatpuffer hergestellt wurden (Versuch 29).

Versuchszeit: 12 Tage.

Anf.-pH	Kein Ca-Zusatz		100 mg $CaSO_4 . 2 H_2O$ je Liter	
	End-pH	Trocken-gewicht mg	End-pH	Trocken-gewicht mg
2,9	2,9	0,1 ± 0,0	2,9	0,1 ± 0,0
3,3	3,2	0,4 ± 0,0	3,2	8,0 ± 0,7
3,7	3,7	6,4 ± 0,3	3,7	29,3 ± 1,0
4,3	4,3	34,4 ± 2,3	4,4	55,5 ± 2,4
4,8	5,1	60,4 ± 2,0	4,8	62,6 ± 1,6
6,0	5,8	108,6 ± 1,4	5,7	124,6 ± 1,8
6,9	6,7	108,5 ± 1,7	6,4	121,7 ± 3,0
7,8	6,8	100,9 ± 1,7	7,8	3,2 ± 0,5

In dem sauersten Gebiet, in dem der Pilz überhaupt wachsen konnte (pH 3,3–4,3), hatte Ca eine sehr kräftige Wirkung. Dies zeigt, dass das Metall auch bei *M. graminum* eine Schutzwirkung gegen hohe Wasserstoffionenkonzentrationen ausübt. Auch bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration hatte Ca indes einen gewissen Effekt, der nicht als Folge des

Antagonismus zwischen den Ca- und den Wasserstoffionen gedeutet werden kann. Es ist denkbar, dass dieser Effekt auf einer Schutzwirkung gegen die verwendeten Phosphate beruhte, deren Konzentration ja ziemlich hoch war (vgl. Versuch 31).

Ein Zusatz von Ca zu der alkalischen Lösung (pH 7,8) hatte zur Folge, dass das Wachstum gehemmt wurde. Ohne Ca-Zusatz ermöglichte diese Lösung dagegen ein Wachstum, das nahezu ebenso gut war wie in den neutralen und schwach sauren Reihen. In der Ca-freien, von Anfang an alkalischen Lösung konnte am Ende des Versuchs eine kräftige Oxalsäurebildung nachgewiesen werden. Diese Säurebildung dürfte die Ursache gewesen sein, dass sich das pH hier im Verlauf des Versuchs von 7,8 auf 6,8 verschob. In den übrigen Reihen konnte Oxalsäure nicht festgestellt werden. Dass die Oxalsäurebildung bei gewissen Pilzen bei alkalischer Reaktion begünstigt wird oder bloss bei solcher stattfinden kann, ist auch von Jacquot (1938) nachgewiesen worden.

Mehrere Ursachen der starken Wachstumshemmung durch Ca in alkalischem Milieu sind denkbar, aber diese Frage muss hier offen gelassen werden.

Um zu untersuchen, ob Ca eine gleichartige Wirkung auf den Pilz hatte, wenn das pH durch Zitratpuffer reguliert wurde, führte ich Versuch 30 aus. Bei diesem Versuch wurden ausserdem *M. androsaceus* C und *M. scorodonius* A herangezogen.

Versuch 30. Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum von Marasmius androsaceus C, M. graminum und M. scorodonius A bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, die mit Zitratpuffer hergestellt wurden (Tab. 42).

Grundlösung:

Glykose	20	g	$FeCl_3$-Lösung (Fe-Konz. 1/500)	0,5	ccm
Asparagin	1	g	$ZnSO_4$-Lösung (Zn-Konz. 1/500)	0,5	ccm
KH_2PO_4	0,5	g	Aneurin	50	γ
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,5	g	H_2O (zweimal dest.)	400	ccm
NaCl	0,5	g			

Diese Lösung wurde teils ohne Ca-Zusatz, teils mit Zusatz von 200 mg $CaCl_2 . 6H_2O$ (umkristallisiert aus dreimal destilliertem Wasser) je 400 ccm Wasser bereitet.

Die verschiedenen pH-Reihen wurden in der Weise zubereitet, dass zu 1 Volumen Grundlösung $1\,^1/_2$ Volumina verschiedener Zitratpufferlösungen zugesetzt wurden. Diese letzteren wurden dadurch hergestellt, dass 0,1-mol. sek. Na-Zitratlösung einerseits mit 0,1-n HCl, andererseits mit 0,1-n NaOH versetzt wurde (Sörensen 1909). Im übrigen wurde der Versuch ebenso ausgeführt wie Versuch 22. Jedem der Kolben, die mit *M. androsaceus* geimpft werden sollten, wurden 10 mγ Biotin zugesetzt.

Der Versuch ergab ziemlich überraschende Resultate. Wenn kein Ca zugesetzt wurde, wirkte der Zitratpuffer stark hemmend auf das Wachs-

Tabelle 42.

Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum einiger *Marasmius*-Arten bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, die mit Zitratpuffer hergestellt wurden (Versuch 30).

Anf.-pH	Kein Ca-Zusatz		200 mg $CaCl_2 . 6 H_2O$ je Liter	
	End-pH	Trocken-gewicht mg	End-pH	Trocken-gewicht mg
	M. androsaceus C. Versuchszeit: 25 Tage.			
1,9	1,9	0,1 ± 0,0	1,9	0,5 ± 0,0
3,0	2,9	1,6 ± 0,1	2,9	7,9 ± 0,7
4,0	3,9	2,0 ± 0,2	3,8	4,3 ± 0,7
4,9	4,9	0,1 ± 0,0	4,8	0,5 ± 0,0
6,0	5,9	0,1 ± 0,0	5,9	0,1 ± 0,0
6,8	6,8	0,1 ± 0,0	6,8	0,1 ± 0,0
	M. graminum. Versuchszeit: 10 Tage.			
1,9	1,9	0,1 ± 0,0	1,9	0,1 ± 0,0
3,0	3,0	0,1 ± 0,0	3,0	0,3 ± 0,0
4,0	4,0	6,1 ± 1,0	4,0	27,1 ± 1,8
4,9	5,0	4,4 ± 0,8	5,1	60,5 ± 2,7
6,0	6,0	1,2 ± 0,4	6,1	88,8 ± 3,5
6,8	6,8	0,2 ± 0,0	6,6	129,6 ± 1,6
	M. scorodonius A. Versuchszeit: 23 Tage.			
1,9	1,9	0,1 ± 0,0	1,9	0,1 ± 0,0
3,0	3,0	1,3 ± 0,1	3,0	4,9 ± 0,5
4,0	4,0	6,0 ± 0,4	4,0	12,1 ± 1,5
4,9	4,9	0,3 ± 0,0	4,8	18,5 ± 1,0
6,0	5,9	0,2 ± 0,0	5,9	0,7 ± 0,1
6,8	6,8	0,2 ± 0,0	6,8	0,2 ± 0,0

tum der Pilze. Diese Hemmung war in den sauersten Lösungen (pH 3–4) am geringsten, nahm aber zu, wenn das pH der Lösung auf Werte über 4 erhöht wurde, und war in der Nähe des Neutralpunkts total (siehe vor allem *M. graminum*). Wenn die Nährlösung mit Ca versetzt wurde, wiesen die Pilze dagegen pH-Kurven auf, die ziemlich gut mit denen übereinstimmten, die bei Versuch 22 mit Phosphatpuffer erhalten worden

waren. Das Optimum lag nämlich für *M. androsaceus* bei pH 3–4, für *M. graminum* nahe dem Neutralpunkt und für *M. scorodonius* bei pH 5. Die durch den Zitratpuffer verursachte Hemmung wurde also durch Ca aufgehoben.

Die Resultate von Versuch 29 können, wie oben bemerkt, so gedeutet werden, dass auch der Phosphatpuffer eine gewisse hemmende Wirkung ausübt, der durch Ca-Zusatz entgegengewirkt wird.

Um genauer festzustellen, wie höhere Konzentrationen verschiedener Alkalisalze bei Zusatz und Weglassung von Ca das Myzelwachstum beeinflussen, führte ich Versuch 31 aus.

Versuch 31. Der Einfluss verschiedener Alkalisalze in stärkerer Konzentration auf das Wachstum von Marasmius graminum bei Zusatz und Weglassung von Kalzium (Tab. 43).

Grundlösung: Die Grundlösung in Versuch 30 mit Zusatz von 0,5 g K_2HPO_4 je 400 ccm Wasser. Diese Lösung wurde wie im vorigen Versuch teils ohne Ca-Zusatz, teils mit Zusatz von 200 mg umkristallisiertem $CaCl_2 . 6 H_2O$ je 400 ccm Wasser bereitet.

Die verschiedenen Reihen wurden in der Weise hergestellt, dass Portionen von 60 ccm sterilisierter Grundlösung nach dem untenstehenden Schema aseptisch mit 90 ccm sterilisierter Salzlösung versetzt wurden, worauf die Lösungen auf trocken sterilisierte 100-ccm-Kolben verteilt wurden. Die Reihen a–f wurden aus Grundlösung bereitet, die keinen Ca-Zusatz erhalten hatte, die Reihen a_1–f_1 in entsprechender Weise aus Grundlösung mit Ca-Zusatz.

Zusätze je 60 ccm Grundlösung in den verschiedenen Reihen:

a und a_1) 90 ccm H_2O.
b und b_1) 90 ccm Na-Zitratpuffer (42 ccm 0,1-mol. sek. Na-Zitrat + 48 ccm 0,1-n NaOH).
c und c_1) 90 ccm K-Zitratpuffer (42 ccm 0,1-mol. sek. K-Zitrat + 48 ccm 0,1-n KOH).
d und d_1) 90 ccm Phosphatpuffer (76 ccm 1/15-mol. KH_2PO_4 + 14 ccm 1/15-mol. Na_2HPO_4).
e und e_1) 90 ccm 0,1-mol. $Na_2SO_4 . 10 H_2O$.
f und f_1) 90 ccm 0,1-mol. K_2SO_4.

Bei dem Versuch wurde nur zweimal destilliertes H_2O verwendet. 6 Parallelkolben.

Das Wachstum erfolgte in sämtlichen Reihen bei ungefähr derselben Wasserstoffionenkonzentration. Die pH-Verschiebungen, welche stattfanden, waren so klein, dass sie keine wesentliche Rolle für das Wachstum des Pilzes spielen konnten.

Von grösstem Interesse ist, dass der Pilz in der Kontrollreihe dieses Versuches nicht auf einen Zusatz von Ca reagierte. Dass Zitratpuffer stark hemmend auf das Wachstum wirkt, bestätigte sich, ebenso, dass Ca

Tabelle 43.

Der Einfluss verschiedener Alkalisalze in stärkerer Konzentration auf das Wachstum von *Marasmius graminum* bei Zusatz und Weglassung von Kalzium (Versuch 31).

Versuchszeit: 10 Tage.

Salzzusatz	Kein Ca-Zusatz			200 mg $CaCl_2 . 6 H_2O$ je Liter		
	Anf.-pH	End-pH	Trockengewicht mg	Anf.-pH	End-pH	Trockengewicht mg
Kontrolle	6,4	6,3	102,5 ± 4,9	6,4	5,7	101,5 ± 3,5
Na-Zitratpuffer . . .	6,2	6,2	8,3 ± 0,8	6,2	6,3	96,8 ± 3,2
K-Zitratpuffer . . .	6,2	6,2	0,9 ± 0,4	6,2	6,3	76,8 ± 2,3
Phosphatpuffer . . .	6,1	6,1	79,7 ± 5,2	6,1	6,1	94,6 ± 1,2
$Na_2SO_4 . 10 H_2O$ . .	6,4	6,7	42,1 ± 1,7	6,4	5,8	99,8 ± 2,3
K_2SO_4	6,4	6,6	46,3 ± 5,2	6,4	5,9	96,6 ± 2,0

diese Hemmung vollständig oder fast vollständig aufhebt. Es ist von gewissem Interesse, dass der K-Zitratpuffer noch stärker hemmend wirkte als der Na-Zitratpuffer. Auch durch den Phosphatpuffer wurde die Wachstumsgeschwindigkeit herabgesetzt, wenngleich in viel geringerem Grade als durch den Zitratpuffer. Auch diese Hemmung wurde durch Ca aufgehoben. Auch Na- und K-Sulfat hemmten das Wachstum. Die Hemmung wurde durch Ca aufgehoben.

Die Schutzwirkungen von Ca gegen verschiedene Salze werden auf S. 150 näher erörtert.

Aus Versuch 31 geht hervor, dass die Ca-Wirkung, wenigstens bei *M. graminum*, ganz auf der Zusammensetzung der Nährlösung beruht. Die bei diesem Versuch verwendete Nährlösung unterscheidet sich in folgenden Beziehungen von der bei Versuch 25 benutzten Nährlösung A mit NaCl und Aneurin, in der die Ca-Wirkung deutlich war:

1) 5 g NH_4-Tartrat (Nährlösung A) wurden durch 1 g Asparagin je Liter ersetzt.

2) 1 g KH_2PO_4 (Nährlösung A) wurde durch 0,5 g KH_2PO_4 + 0,5 g K_2HPO_4 je Liter ersetzt.

Das Anfangs-pH wurde durch diese Massnahmen von 5,5 (Nährlösung A) auf 6,4 erhöht. Da der Pilz ausserdem eine stärkere Verschiebung des pH nach der sauren Seite verursacht, wenn er in einer Lösung mit NH_4-Tartrat, als wenn er in einer mit Asparagin wächst, erscheint es sehr wohl möglich, dass die Ca-Wirkung in einer Lösung mit NH_4-Tartrat und einem Anfangs-pH von 5,5 wenigstens bei *M. graminum* wesentlich auf der ant-

agonistischen Wirkung des Metalls gegen Wasserstoffionen beruht. Man kann es indes nicht für ausgeschlossen halten, dass Ca auch gegen NH_4- oder Tartrationen oder gegen diese beiden Ionen schützend wirkt.

Die Resultate der Versuche 29–31 zeigten, dass man bei Untersuchungen über die Abhängigkeit der Ca-Wirkung von der Wasserstoffionenkonzentration die letztere nicht durch Zusatz von SÖRENSENS Phosphat- oder Zitratpufferlösungen regulieren kann. Diese üben nämlich auf das Wachstum eine mehr oder minder starke Hemmungswirkung aus, der durch Ca entgegengewirkt wird. Eine antagonistische Wirkung von Ca gegen die Wasserstoffionen kann deshalb unter diesen Bedingungen nicht mit voller Deutlichkeit hervortreten. Es müsste indes möglich sein, ohne störende Einwirkung anderer Faktoren die Abhängigkeit des Ca-Effekts vom pH zu studieren, indem man von der bei Versuch 31 verwendeten Nährlösung ausginge und ihr pH durch Zusatz von HCl allein regulierte.

Versuch 32. Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum von Marasmius graminum in asparaginhaltiger Nährlösung, deren Wasserstoffionenkonzentration durch Zusatz verschiedener Mengen Salzsäure reguliert wurde (Tab. 44).

Nährlösung:

Glykose	20	g	$FeCl_3$-Lösung (Fe-Konz. 1/500)	0,5	ccm
Asparagin	1	g	$ZnSO_4$-Lösung (Zn-Konz. 1/500)	0,5	ccm
KH_2PO_4	0,5	g	Aneurin	50	γ
K_2HPO_4	0,5	g	H_2O (zweimal dest.)	1000	ccm
$MgSO_4 . 7\,H_2O$	0,5	g			

Diese Lösung hatte ein pH von 6,4. Durch Zusatz von 22,5 bzw. 30,0 ccm 0,1-n HCl je Liter wurde das pH auf 5,5 bzw. 4,2 verschoben. Der Pilz wurde bei jedem der genannten pH-Werte mit und ohne Zusatz von Ca (umkristallisiertes $CaCl_2 . 6\,H_2O$) in der Konzentration 1 mMol je Liter gezüchtet.

Tabelle 44.

Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum von *Marasmius graminum* in asparaginhaltiger Nährlösung, deren Wasserstoffionenkonzentration durch Zusatz verschiedener Mengen Salzsäure reguliert wurde (Versuch 32).

Versuchszeit: 10 Tage.

Anf.-pH	Kein Ca-Zusatz		1 mMol Ca je Liter	
	End-pH	Trocken-gewicht mg	End-pH	Trocken-gewicht mg
4,2	4,2	4,4 ± 0,5	4,2	22,5 ± 0,5
5,5	5,5	61,6 ± 1,8	5,6	85,2 ± 3,4
6,4	6,4	108,7 ± 4,9	5,8	110,6 ± 3,8

Der Versuch bestätigte, dass die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes in der asparaginhaltigen Nährlösung bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration nicht durch Zusatz von Ca beeinflusst wird. Indes ist zu beachten, dass sowohl bei diesem als bei dem vorhergehenden Versuch das pH in der Ca-Reihe stärker in saurer Richtung verschoben wurde als in der Kontrollreihe, obgleich die Myzelerzeugung in beiden Reihen ungefähr dieselbe war. Dies lässt sich vielleicht so deuten, dass das Metall eine gewisse Rolle beim Stoffwechsel des Pilzes auch in den Fällen spielt, wo es die Wachstumsgeschwindigkeit nicht deutlich beeinflusst.

Wenn die Wasserstoffionenkonzentration erhöht wurde, trat die günstige Wirkung des Ca auf das Wachstum des Pilzes immer stärker hervor. Schon bei pH 5,5 war diese Wirkung deutlich erkennbar, und bei pH 4,2 wurde in der Ca-Reihe ca. fünfmal mehr Myzel erhalten als in der Ca-freien. Das Resultat von Versuch 32 scheint mir stark die Annahme zu stützen, dass die günstige Wirkung, die Ca auf das Wachstum von *M. graminum* ausübt, wenn dieser Pilz in NH_4-Tartrathaltiger Nährlösung gezüchtet wird, wesentlich auf der Schutzwirkung des Metalls gegen supraoptimale Wasserstoffionenkonzentrationen beruht. Bei Versuch 25, wo der Ca-Effekt sehr kräftig war, betrug das Anfangs-pH 5,5 und das End-pH in der Reihe ohne Ca 4,8 und in der Reihe mit Ca 4,7, d. h. das Wachstum vollzog sich in einem pH-Gebiet, wo Ca infolge seiner Schutzwirkung gegen die Wasserstoffionen das Wachstum stark fördert.

Um zu untersuchen, ob der Ca-Effekt im allgemeinen dadurch ausgeschaltet werden konnte, dass die Pilze in asparaginhaltigen Nährlösungen mit optimaler Wasserstoffionenkonzentration gezüchtet wurden, und um bei verschiedenen Objekten den Antagonismus zwischen Ca und den Wasserstoffionen zu studieren, stellte ich Versuch 33 an.

Versuch 33. Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum einiger Marasmius-Arten in asparaginhaltiger Nährlösung, deren Wasserstoffionenkonzentration durch Zusatz von Salzsäure reguliert wurde (Tab. 45).

Der Versuch wurde wie Versuch 32 ausgeführt. Ca wurde hier jedoch in der Konzentration 0,5 mMol je Liter zugesetzt. Die Lösungen mit pH 3,1 und 2,5 wurden durch Zusatz von 50 bzw. 120 ccm 0,1-n HCl je Liter Nährlösung erhalten. Zweimal destilliertes H_2O. 6 Parallelkolben.

Die pH-Verschiebungen waren bei diesem Versuch natürlich grösser als bei dem mit starken Pufferlösungen ausgeführten Versuch 22. Mit Ausnahme von *M. foetidus* verschoben indes die Pilze das pH ziemlich mässig.

M. alliaceus reagierte auch bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration positiv auf einen Zusatz von Ca. Die Versuchsreihen mit diesem

Tabelle 45.

Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum einiger *Marasmius*-Arten in asparaginhaltiger Nährlösung, deren Wasserstoffionenkonzentration durch Zusatz verschiedener Mengen Salzsäure reguliert wurde (Versuch 33).

Anf.-pH	Kein Ca-Zusatz		0,5 mMol Ca je Liter	
	End-pH	Trocken-gewicht mg	End-pH	Trocken-gewicht mg
	M. alliaceus. Versuchszeit: 20 Tage.			
4,1	4,0	4,0 ± 0,2	3,9	6,1 ± 0,5
5,5	5,4	4,8 ± 0,3	5,3	7,9 ± 0,3
6,4	6,3	1,4 ± 0,1	6,3	2,6 ± 0,5
	M. epiphyllus. Versuchszeit: 13 Tage.			
4,1	4,3	3,4 ± 0,2	4,3	10,0 ± 0,3
5,5	5,3	20,3 ± 1,2	5,0	30,5 ± 1,3
6,4	5,7	25,5 ± 2,3	5,4	39,0 ± 3,3
	M. foetidus A. Versuchszeit: 11 Tage.			
2,5	2,4	1,6 ± 0,1	2,4	1,7 ± 0,1
3,1	3,0	3,7 ± 0,2	2,9	3,9 ± 0,1
4,1	3,2	3,1 ± 0,1	3,0	3,6 ± 0,2
5,5	3,3	2,8 ± 0,1	3,1	3,7 ± 0,1
	M. rotula C. Versuchszeit: 14 Tage.			
4,1	4,7	0,9 ± 0,2	4,6	5,5 ± 0,9
5,5	5,8	15,3 ± 2,2	5,6	12,8 ± 2,2
6,4	6,5	16,4 ± 2,9	6,4	16,9 ± 1,7
	M. scorodonius A. Versuchszeit: 11 Tage.			
3,1	3,1	1,6 ± 0,2	2,9	3,6 ± 0,2
4,1	4,0	4,7 ± 0,2	3,9	4,4 ± 0,3
5,5	5,2	3,3 ± 0,2	4,7	5,7 ± 0,2
6,4	5,6	3,5 ± 0,2	5,2	5,2 ± 0,2

Pilz umfassten keine deutlich supraoptimale Wasserstoffionenkonzentration.

Es ist möglich, dass bei dem Versuch mit *M. epiphyllus* auch die Wasserstoffionenkonzentration der am wenigsten sauren Lösung etwas zu hoch war, als dass der Pilz mit maximaler Geschwindigkeit hätte wachsen können. Der Ca-Effekt war jedoch in sämtlichen Lösungen sehr stark, und es ist wahrscheinlich, dass der Pilz auch bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration auf das Metall reagiert hätte.

Bei dem Versuch mit *M. foetidus* verschob sich das pH stark nach der sauren Seite. Eine deutliche Ca-Reaktion konnte in diesem Fall kaum konstatiert werden.

M. rotula verhielt sich ebenso wie *M. graminum* (Versuch 32). Bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration hatte Ca keine Wirkung, bei supraoptimaler war der Ca-Effekt dagegen deutlich.

M. scorodonius reagierte deutlich positiv auf Ca bei supraoptimaler Wasserstoffionenkonzentration. Ohne Ca-Zusatz wuchs der Pilz am besten bei pH 4, mit Ca wurden die grössten Ernten wie in Versuch 22 bei pH 5–6 erhalten. Dies beruhte darauf, dass der Pilz in den weniger sauren Lösungen bei Anwesenheit von Ca Membranen im Zentrum der schwimmenden Kolonien bildete, was in den entsprechenden „Ca-freien" Lösungen nicht der Fall war. Auch bei diesem Pilz hatte also Ca deutlichen Einfluss auf die morphologische Ausbildung des Myzels (vgl. *M. alliaceus* S. 129).

Die Untersuchungen über die Abhängigkeit der Ca-Wirkung von der Wasserstoffionenkonzentration wurden nicht auf weitere Arten ausgedehnt. Die vorliegenden Resultate zeigen indes, dass diese Wirkung wenigstens in gewissen Fällen (*M. graminum*, *M. rotula*) ganz fortfällt, wenn die Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung optimal ist und die Stickstoffquelle in einer Verbindung besteht, die bei der Aufnahme des Stickstoffs keine stärkeren Säuren bildet. Wird die Wasserstoffionenkonzentration auf supraoptimale Werte erhöht, so hat indes Ca auch in einer Nährlösung mit einer solchen Stickstoffquelle deutlich günstige Wirkung auf das Wachstum der Pilze. Dieser Effekt muss auf der antagonistischen Wirkung des Ca gegen die Wasserstoffionen beruhen.

M. alliaceus und *M. epiphyllus* reagierten indes in Versuch 33 auch bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration positiv auf Ca. Auch ein Teil der in Versuch 25 untersuchten Pilze, welche auf Ca reagierten, wuchs während des ganzen Versuchs bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration. Dies zeigt, dass der Antagonismus zwischen Ca und den Wasserstoffionen bei verschiedenen Arten nicht die einzige Ursache des Ca-Effekts sein kann.

Die Abhängigkeit der Kalziumwirkung von der Ammoniumtartratkonzentration.

Wegen des grossen Unterschiedes der Wirkung von Ca in einer Nährlösung, die NH_4-Tartrat als N-Quelle enthält, und in einer solchen, die statt dessen Asparagin enthält, muss man es, wie oben bemerkt, für möglich halten, dass die Ca-Wirkung direkt dadurch vom NH_4-Tartratgehalt der Lösung abhängig ist, dass Ca gegen schädliche Konzentrationen dieses Salzes schützt. Um diese Annahme zu prüfen, untersuchte ich in Versuch 34 den Effekt von Ca in einer Nährlösung, deren NH_4-Tartratkonzentration variiert wurde. Liegt bei der von mir im allgemeinen verwendeten NH_4-Tartratkonzentration (5 g/l) eine Schutzwirkung von Ca gegen dieses Salz vor, so muss ja die Ca-Wirkung bei schwächeren NH_4-Tartratkonzentrationen geringer sein.

Versuch 34. Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum von Marasmius graminum bei verschiedenen NH_4-Tartratkonzentrationen (Tab. 46).

Grundlösung: Nährlösung A mit 0,5 g NaCl und 50 γ Aneurin je Liter, aber ohne NH_4-Tartrat. Zweimal destilliertes Wasser.

6 Reihen mit verschiedenen NH_4-Tartratkonzentrationen nach Tab. 46.

Tabelle 46.

Der Einfluss von Kalzium auf das Wachstum von *Marasmius graminum* bei verschiedenen NH_4-Tartratkonzentrationen (Versuch 34).

Versuchszeit: 11 Tage.

NH_4-Tartrat g je Liter	Kein Ca-Zusatz			0,5 mMol Ca je Liter		
	Anf.-pH	End-pH	Trockengewicht mg	Anf.-pH	End-pH	Trockengewicht mg
0	4,5	4,5	0,3 ± 0,0	4,5	4,5	0,3 ± 0,0
1	5,4	4,0	21,9 ± 1,0	5,4	3,7	46,7 ± 2,1
2	5,5	4,4	25,7 ± 1,0	5,5	4,1	53,2 ± 2,9
3	5,5	4,5	26,5 ± 1,0	5,5	4,3	59,2 ± 1,7
4	5,5	4,7	23,4 ± 1,3	5,5	4,5	56,8 ± 2,1
5	5,5	4,7	23,2 ± 1,1	5,5	4,5	63,1 ± 1,2

Der Zusatz von Ca hatte bei sämtlichen NH_4-Tartratkonzentrationen gleich starke Wirkung, indem die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes auf etwas mehr als das Doppelte erhöht wurde. Die schützende Wirkung, die Ca möglicherweise gegen höhere NH_4-Tartratkonzentrationen ausübt, hat also keine nennenswerte Bedeutung für den hier konstatierten Einfluss des Metalls auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes.

Im übrigen geht aus dem Versuch hervor, dass das NH_4-Tartrat bei den stärkeren hier verwendeten Konzentrationen eine deutliche Pufferwirkung hat, was wahrscheinlich von Vorteil sein kann, wenn man säureempfindliche Arten züchten will. An und für sich bedeutet indes eine NH_4-Tartratkonzentration von 5 g/l eine Überdosierung der N-Quelle.

d. *Kann Kalzium durch Strontium ersetzt werden?*

Wenn die günstige Wirkung von Ca wesentlich auf der antagonistischen Wirkung des Metalls gegen verschiedene Ionen beruht, muss Ca in mehr oder weniger hohem Grade durch nahestehende Metalle, in erster Linie Sr, ersetzt werden können. Rippel & Stoess (1932) fanden auch, dass Ca bei gewissen niederen Pilzen ganz oder teilweise durch Sr ersetzt werden kann. Wegen der übrigen Literatur über die Möglichkeit, bei verschiedenen Pflanzen Ca durch Sr zu ersetzen, verweise ich auf Pirschle (1938).

In Versuch 35 wurde die Möglichkeit untersucht, bei gewissen *Marasmius*-Arten Ca durch Sr zu ersetzen. Als Objekt wurden *M. graminum* und *M. rotula* gewählt, d. h. die Arten, für die ich hatte nachweisen können, dass die Ca-Wirkung ganz auf der Zusammensetzung des Mediums beruht.

Versuch 35. Untersuchung über die Möglichkeit, bei Marasmius graminum und M. rotula Kalzium durch Strontium zu ersetzen (Tab. 47).

Nährlösung A mit 0,5 g NaCl und 50 γ Aneurin je Liter. Sr wurde als $SrCl_2 . 6 H_2O$ zugesetzt. Zweimal destilliertes Wasser. 3 Reihen nach Tab. 47. 6 Parallelkolben.

Tabelle 47.

Der Einfluss von Kalzium und Strontium auf das Wachstum von *Marasmius graminum* und *M. rotula* (Versuch 35).

Versuchsobjekt	Versuchszeit in Tagen	Kein Zusatz		0,5 mMol Ca je Liter		0,5 mMol Sr je Liter	
		Trockengewicht mg	End-pH	Trockengewicht mg	End-pH	Trockengewicht mg	End-pH
M. graminum . .	11	23,2 ± 1,1	4,7	63,1 ± 1,2	4,5	50,3 ± 1,5	4,5
M. rotula C . . .	20	2,4 ± 0,2	5,3	24,7 ± 1,7	4,7	5,8 ± 0,4	5,1

Durch Zusatz von Sr wurde die Wachstumsgeschwindigkeit bei beiden Pilzen ungefähr auf das Doppelte erhöht. Bei *M. graminum* war die Sr-Wirkung fast ebenso stark wie die Ca-Wirkung, bei *M. rotula* dagegen bedeutend schwächer. Um die Frage der Ersetzung von Ca durch Sr vollständig

zu klären, dürften umfangreichere Versuche erforderlich sein. Die Resultate von Versuch 35 zeigen indes, dass die Ca-Wirkung grossenteils nicht spezifisch ist. Dadurch bestätigen sie, dass diese Wirkung in hohem Grade durch den physikalisch-chemischen Einfluss des Metalls auf die lebenden Zellen bedingt ist.

e. *Zusammenfassung und Besprechung der Resultate der Untersuchungen über die Kalziumwirkung.*

Ein Zusatz von Ca zu einer Nährlösung, die als N-Quelle NH_4-Tartrat enthält, und deren pH 5,5 ist (Nährlösung A), hat kräftig fördernde Wirkung auf das Wachstum der meisten hier untersuchten *Marasmius*-Arten. Dieser Effekt tritt bei gewissen Arten schon bei einem Ca-Zusatz von 0,005 mMol (0,2 mg) je Liter hervor und nimmt mit der Ca-Konzentration zu, bis diese mindestens 0,5 mMol (20 mg) je Liter beträgt.

Die Frage, inwieweit die Ca-Wirkung eine Folge des antagonistischen Einflusses von Ca gegenüber anderen Ionen ist und also auf der Zusammensetzung der Nährlösung beruht, ist näher untersucht worden.

In erster Linie wurde untersucht, ob die Ca-Wirkung auf einer antagonistischen Wirkung von Ca gegen Mg beruht. Als Versuchsobjekt diente *M. rotula*. Die Konzentration des Mg-Sulfats wechselte zwischen 0,02 und 12,5 g je Liter. Der Pilz zeigte grosse Toleranz gegen hohe Konzentrationen dieses Salzes. Ca hatte bei allen Mg-Konzentrationen günstigen Einfluss auf das Wachstum, aber eine antagonistische Wirkung gegen Mg konnte nicht konstatiert werden. Die Untersuchungen zeigen, dass man die Bedeutung der antagonistischen Wirkung von Ca gegen Mg nicht überschätzen darf, welche bloss bei extrem hohen Mg-Konzentrationen zutage tritt (vgl. Rippel & Stoess 1932).

Schon die ersten orientierenden Untersuchungen über die Ca-Wirkung auf die Pilze ergaben, dass unter den oben genannten Bedingungen die säureempfindlichsten Arten am stärksten auf das Metall reagieren. Es erschien deshalb wahrscheinlich, dass die Ca-Wirkung wenigstens bei diesen Arten teilweise durch die antagonistische Wirkung des Metalls gegen die Wasserstoffionen bedingt ist. In der Folge wurde eine Reihe von Versuchen angestellt, welche bezweckten, die Abhängigkeit der Ca-Wirkung von der Wasserstoffionenkonzentration klarzustellen. Das pH konnte bei diesen Untersuchungen nicht mittels Sörensens Pufferlösungen reguliert werden, weil diese selbst eine mehr oder minder stark hemmende Wirkung ausüben, der von Ca entgegengewirkt wird (vgl. unten). Es erwies sich indes als möglich, ohne störenden Einfluss anderer Faktoren die Abhängigkeit der Ca-Wirkung vom pH durch Verwendung einer Nährlösung zu studieren, in der das NH_4-Tartrat durch Asparagin ersetzt war,

und deren pH durch Zusatz von HCl reguliert wurde. Mehrere Arten wuchsen in dieser Lösung unter relativ kleinen pH-Verschiebungen.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Arten war die Ca-Wirkung am kräftigsten bei supraoptimaler Wasserstoffionenkonzentration. Hier trat also die auch bei andern Mikroorganismen nachgewiesene Schutzwirkung von Ca gegen die Wasserstoffionen hervor (vgl. LUNDEGÅRDH 1924, TAMIYA 1928, WARIS 1939 u. a.). Bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration verhielten sich die Pilze verschieden. Gewisse Arten (*M. graminum*, *M. rotula*) wurden unter solchen Verhältnissen nicht durch einen Zusatz von Ca beeinflusst, während bei andern (z. B. *M. alliaceus*) das Wachstum auch in diesem Fall durch einen solchen Zusatz gefördert wurde.

Eine Untersuchung über das Vorhandensein einer Schutzwirkung von Ca gegen NH_4-Tartrat, wenn die Lösung 0,1–0,5 % dieses Salzes enthielt, ergab negatives Resultat. Man muss es also für wahrscheinlich halten, dass die kräftige Ca-Wirkung in einer Nährlösung mit 0,5 % NH_4-Tartrat und einem Anfangs-pH von 5,5 wenigstens bei solchen Pilzen wie *M. graminum* und *M. rotula* wesentlich auf der antagonistischen Wirkung von Ca gegen die Wasserstoffionen beruht.

Für die Arten, die bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration auf Ca reagieren, muss indes das Metall auch in anderer Weise von Bedeutung sein. Wenigstens bei manchen dieser Arten hat Ca einen fördernden Einfluss auf die Entwicklung des Luftmyzels. So scheint z. B. Ca bei *M. alliaceus* die Luftmyzelbildung überhaupt zu fördern, und bei *M. scorodonius* wird die Ausbildung von Membranen in den älteren Teilen des Myzels begünstigt. Die Ursachen dieser Wirkung sind jedoch nicht näher untersucht worden.

Bei den Untersuchungen über die Abhängigkeit der Ca-Wirkung vom pH wurde festgestellt, dass Ca auch eine erhebliche Schutzwirkung gegen verschiedene Alkalisalze in höheren Konzentrationen ausübt.

SÖRENSENS Phosphatpuffer (Phosphatkonzentration 40 mMol/l) und Zitratpuffer (Zitratkonzentration 28 mMol/l) sowie K- und Na-Sulfat (60 mMol/l) wirkten deutlich hemmend auf das Wachstum von *M. graminum*. Diese Hemmung wurde mehr oder weniger vollständig durch einen Zusatz von Ca aufgehoben. Besonders stark war der hemmende Einfluss des Zitratpuffers. Diese Wirkung war in gewissem Grade vom pH der Lösung abhängig: bei pH 6–7 war die Hemmung total, bei pH 3–4 war sie am wenigsten ausgesprochen.

Bei neutraler Reaktion sind die Alkalizitrate vollständig dissoziiert und also die Zitrationenkonzentration maximal. Die Hemmungswirkung der Zitrate war in den Versuchen 30 und 31 bei pH 6,0–6,8 total oder fast total, während die gleichfalls völlig dissoziierten K- und Na-Sulfate, in

noch grösseren Mengen als die Zitrate zugesetzt, bei weitem nicht eine so starke Hemmungswirkung ausübten. Hieraus kann man schliessen, dass die Zitrationen besonders stark hemmend auf die Myzelien wirken. Dass der hemmende Einfluss bei pH 3–4 schwächer ist, dürfte darauf beruhen, dass die Dissoziation der Zitronensäure hier zurückgedrängt ist (Dissoziationskonstante $8 \cdot 10^{-4}$). Ca hebt also in diesem Fall die schädlichen Wirkungen negativer Ionen auf. Von einer Reaktion zwischen Ca- und Zitrationen in der Lösung kann nicht die Rede sein, da z. B. in Versuch 31 die Ca-Konzentration 0,9 mMol und die Zitratkonzentration 28 mMol je Liter betrug. Wahrscheinlich übt Ca seine Schutzwirkung auf der Oberfläche des Protoplasmas der Organismen aus. Wie diese Ca-Wirkung im übrigen zustande kommt, muss hier dahingestellt bleiben.

Es ist von Interesse, dass der K-Zitratpuffer stärker hemmend wirkte als der Na-Zitratpuffer. Lundegårdh (1940) hat gefunden, dass K im Vergleich mit andern Metallionen besonders kräftig permeabilitätssteigernd, ja sogar auflösend auf das Protoplasma wirkt. Dass die schädlichen Zitrationen in Kombination mit K stärkere Wirkungen haben als in Verbindung mit Na, steht gut im Einklang mit diesen Resultaten.

Untersuchungen über die Möglichkeit, Ca durch Sr zu ersetzen, wurden mit *M. graminum* und *M. rotula* ausgeführt. Bei beiden Arten war eine solche Ersetzung partiell möglich. Auch dies spricht dafür, dass die Ca-Wirkung in wesentlichem Grade eine Folge der physikalisch-chemischen Wirkung des Metalls auf das Plasma ist.

Die Ca-Wirkung bei den *Marasmius*-Arten ist also in grossem Umfang eine Folge der antagonistischen Wirkung des Metalls gegen andere Ionen. Ob Ca ein für die Pilze in kleinen Mengen absolut notwendiges Element ist, lässt sich jedoch auf Grund der hier mitgeteilten Versuchsresultate nicht entscheiden. Um dieses Problem zu lösen, muss man Versuche mit Nährlösungen vornehmen, die in erheblich höherem Grade, als es hier der Fall war, von Verunreinigungen durch das Metall befreit worden sind.

3. Der Einfluss von Zink.

Wie früher erwähnt (S. 116), nahm bereits Raulin (1869) an, dass Zn ein für *Aspergillus niger* notwendiges Element ist, wenngleich dies erst durch Steinbergs (1919), Bortels' (1927) und Robergs (1928, 1931) Untersuchungen endgültig bewiesen wurde. Ausführliche Übersichten über die Literatur auf diesem Gebiet geben die drei letztgenannten Forscher sowie Pirschle (1939).

Zn ist wie die übrigen „Spurenelemente" in äusserst schwachen Konzentrationen wirksam. Um den Einfluss dieses Metalls auf Pilze studieren

zu können, muss man deshalb Nährlösungen mit gut definierter Zusammensetzung verwenden. Die Herstellung solcher Nährlösungen für die auxoheterotrophen Pilze war erst in den letzten Jahren möglich, als die erforderlichen Wuchsstoffpräparate in chemisch reiner Form zugänglich geworden waren, und die Bedeutung von Zn für diese Pilze konnte deshalb erst ziemlich spät studiert werden. So musste z. B. Metz, welcher 1930 die Bedeutung von Zn für Pilze mit verschiedener systematischer Stellung zu erforschen suchte, die Frage offen lassen, wie sich die Basidiomyzeten zu diesem Metall verhalten.

Leonian & Lilly (1940) untersuchten den Einfluss von Spurenelementen auf *Phycomyces Blakesleeanus* und fanden, dass man der Nährlösung ausser Fe auch Zn zusetzen muss, um maximales Wachstum zu erzielen. Über die Bedeutung von Zn für Hymenomyzeten habe ich keine sicheren Angaben in der Literatur gefunden.

a. *Der Einfluss von Zink im Überschuss.*

Schon zu Beginn meiner Untersuchungen hatte ich meine Aufmerksamkeit auf die Bedeutung von Zn für die *Marasmius*-Arten gerichtet. Orientierende Versuche mit einer geringen Anzahl Arten ergaben, dass ein Zusatz von Zn wenigstens in gewissen Fällen die Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze erheblich steigerte, obgleich die Nährlösungen aus Chemikalien bereitet waren, die keinem speziellen Reinigungsverfahren unterworfen worden waren. Von diesen vorbereitenden Untersuchungen sei hier bloss ein Versuch mitgeteilt, der mit *M. scorodonius* ausgeführt wurde.

Versuch 36. Der Einfluss von Zink auf das Wachstum von Marasmius scorodonius A (Tab. 48).

Nährlösung:

Glykose	10 g	$MgSO_4 . 7 H_2O$		0,5 g	
$NH_4H_2PO_4$	1,15 g	$FeCl_3 . 6 H_2O$ (1 %ige Lösung)		10	Tropfen
KH_2PO_4	0,25 g	Aneurin		50	γ
K_2HPO_4	0,25 g	H_2O (zweimal dest.)		1000	ccm
		pH nach Autoklavieren 5,5.			

Zn wurde hier wie bei früheren Versuchen in Form von $ZnSO_4 . 7 H_2O$ zugesetzt, und zwar von einer Vorratslösung mit einer Zn-Konzentration von 1 : 500, d. h. 8,796 g $ZnSO_4 . 7 H_2O$ je Liter. Der Versuch umfasste 4 Reihen nach Tab. 48. 6 Parallelkolben.

Ein Zusatz von 1 mg Zn je Liter hatte zur Folge, dass sich die Wachstumsgeschwindigkeit von *M. scorodonius* verdoppelte. 10 mg Zn je Liter hatten ungefähr dieselbe Wirkung wie 1 mg je Liter, möglicherweise war die Wachstumsgeschwindigkeit bei der höheren Konzentration etwas herabgesetzt. 100 mg Zn je Liter hemmten das Wachstum vollständig.

Tabelle 48.

Der Einfluss von Zink auf das Wachstum von *Marasmius scorodonius* A (Versuch 36).

Versuchszeit: 22 Tage.

mg Zn je Liter	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓
0	9,2 ± 0,7	3,9
1	20,8 ± 1,1	3,1
10	17,2 ± 0,6	3,1
100	0,2 ± 0,0	5,2

Um den Effekt verschiedener Spurenelemente mit Erfolg studieren zu können, muss man von Nährlösungen ausgehen, die nicht durch störende Mengen dieser Elemente verunreinigt sind. Die „analysenreinen" Chemikalien, die jetzt fabrikmässig hergestellt werden, enthalten gewöhnlich so kleine Mengen Verunreinigungen, dass sie ohne weitere Reinigungsprozeduren bei gewissen qualitativen Untersuchungen über die Spurenelemente benutzt werden können. Indes sind mehrere Methoden ausgearbeitet worden, um Nährlösungen vollständiger von schweren Metallen zu reinigen.

Seit langem hat man versucht, die verschiedenen Nährsalze durch Umkristallisation von Verunreinigungen zu befreien. Mit diesem Verfahren erzielt man jedoch nur eine ziemlich unvollständige Reinigung. Durch Behandlung der Nährlösungen mit stark adsorbierenden Mitteln kann man Lösungen erhalten, die vollständiger von schweren Metallen gereinigt sind. Diese Methode wurde von Steinberg (1919) eingeführt, welcher Ca-Karbonat als Adsorbens verwendete. Derselbe Forscher (Steinberg 1935 b) hat später nachgewiesen, dass auch basisches Mg-Karbonat für diesen Zweck brauchbar ist. Bortels (1927) benutzte mit Erfolg aktive Kohle.

Wenn man die Nährlösungen mit solchen adsorbierenden Mitteln behandelt, führt man indes, wie Roberg (1928, S. 334) hervorhebt, unbekannte Faktoren in die Experimente ein. So adsorbieren z. B. die Karbonate erhebliche Mengen Phosphat und Sulfat (Steinberg 1919, S. 358). Bei Benutzung von Kohle können unbekannte Mengen verschiedener Salze in Lösung gehen und gleichzeitig gewisse Mengen der Nährstoffe von der Kohle gebunden werden (Roberg 1931, Lohmann 1934, S. 39). Bei meinen fortgesetzten Studien über den Einfluss von Zn auf die *Marasmius*-Arten suchte ich deshalb den Gehalt der Nährlösungen an schweren Me-

tallen zu vermindern, indem ich umkristallisierte Salze sowie besonders gereinigtes Wasser und besonders gereinigtes Glas verwandte.

$MgSO_4 . 7 H_2O$, $Na_2HPO_4 . 12 H_2O$, NaCl und Asparagin wurden einmal aus dreimal destilliertem Wasser umkristallisiert. Auch das bei den Versuchen zugesetzte Zn-Sulfat wurde in dieser Weise gereinigt. KH_2PO_4 und Glykose wurden in dreimal destilliertem Wasser gelöst und dann durch Zusatz von Äthylalkohol (gereinigt durch doppelte Destillation in einer Apparatur aus Jenaer Geräteglas 20) ausgefällt. Über den Gehalt der umkristallisierten Salze an Verunreinigungen siehe Tab. 36, S. 123.

Für die Nährlösungen wurde nur dreimal destilliertes Wasser benutzt.

Alle Kolben und Pipetten wurden nach der gewöhnlichen Reinigung mit Bichromatschwefelsäure ungefähr eine halbe Stunde mit strömendem Wasserdampf behandelt.

Wenn die Impfung von Malzagar stattfindet, wird eine unbestimmte Menge Metalle, darunter sicher auch Zn, in die Nährlösung eingeführt. Um die auf diese Weise zugeführte Metallmenge herunterzubringen, suchte ich bei zwei Versuchen, bei denen *M. scorodonius* als Versuchsobjekt diente, die Impfung von einem Substrat vorzunehmen, das aus gut gewaschenem Agar + synthetischer Nährlösung bestand, die mit Aneurin, aber nicht mit Zink, versetzt worden war. Auf diesem Substrat bildete der Pilz ein dünnes Myzel. Nachdem die Impfstücke in gewöhnlicher Weise in die Versuchskolben verbracht worden waren, zeigte sich indes, dass das Myzel äusserst unregelmässig auswuchs. In mehreren Kolben unterblieb das Wachstum ganz, während in andern Kolben derselben Reihen das Myzel in normaler Weise auswuchs. Ich musste deshalb darauf verzichten, die Metallmenge im Impfmaterial auf diese Weise zu vermindern, und nahm in der Folge die Impfung stets von gewöhnlichem Malzagar vor.

In Versuch 37 untersuchte ich die Wirkung von Zn in der Konzentration 1 mg je Liter auf das Wachstum der verschiedenen *Marasmius*-Arten.

Versuch 37. Der Einfluss von Zink auf das Wachstum der Pilze (Tab. 49).

Grundlösung:

Glykose	10	g	$CaSO_4 . 2 H_2O$	0,1	g
KH_2PO_4	0,5	g	$MnSO_4 . 4 H_2O$	0,01	g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5	g	$FeCl_3$-Lösung (Fe-Konz. 1/500)	0,5	ccm
NaCl	0,1	g	Aneurin	50	γ
			H_2O (dreimal dest.)	1000	ccm

Nach der verschiedenen Fähigkeit der Pilze, auf den Stickstoffquellen Asparagin und NH_4Cl zu wachsen (vgl. Versuch 1), sowie nach ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung teilte ich dieselben in drei Gruppen ein. Für jede dieser Gruppen wurde eine besondere Nährlösung bereitet:

1. Die Grundlösung versetzt mit 1 g NH_4Cl je Liter. pH 4,4.
2. Die Grundlösung versetzt mit 1 g Asparagin je Liter. pH 4,4.
3. Die Grundlösung versetzt mit 1 g Asparagin und 0,5 g $Na_2HPO_4 . 12 H_2O$ je Liter. pH 6,1.

Bei *M. androsaceus* wurde Biotin (10 mγ je Kolben) zugesetzt.

Tabelle 49.

Der Einfluss von Zink auf das Wachstum der Pilze (Versuch 37).

Versuchsobjekt	Versuchszeit in Tagen	Kein Zusatz		1 mg Zn je Liter	
		Trockengewicht mg	End-pH	Trockengewicht mg	End-pH
Gruppe 1 (Anf.-pH 4,4)					
M. perforans A	30	11,6 ± 0,8	2,8	12,3 ± 0,9	2,9
M. putillus	30	10,0 ± 0,9	2,6	15,6 ± 0,8	2,5
Gruppe 2 (Anf.-pH 4,4)					
M. androsaceus C	23	21,6 ± 0,6	3,0	21,2 ± 0,5	3,0
M. foetidus A	35	9,1 ± 0,5	2,5	13,9 ± 0,9	2,6
M. peronatus A	35	8,0 ± 0,4	4,5	23,9 ± 2,0	4,8
M. ramealis C	25	15,3 ± 0,8	3,7	21,9 ± 1,2	3,8
M. scorodonius A	20	8,2 ± 0,3	4,5	23,9 ± 1,6	4,3
Gruppe 3 (Anf.-pH 6,1)					
M. alliaceus	35	13,6 ± 1,1	5,3	14,1 ± 1,0	5,3
M. chordalis	35	22,9 ± 2,6	6,3	26,1 ± 1,4	6,0
M. epiphyllus	23	47,2 ± 2,2	5,7	80,2 ± 2,1	5,6
M. fulvobulbillosus C	40	24,6 ± 2,2	3,7	21,6 ± 5,0	3,7
M. graminum	20	54,6 ± 0,5	6,0	102,9 ± 2,2	6,0
M. rotula C	23	20,4 ± 1,2	6,0	21,1 ± 2,8	5,9

Die verschiedenen Arten reagierten sehr ungleich auf einen Zusatz von Zn. *M. perforans*, *M. androsaceus*, *M. alliaceus*, *M. fulvobulbillosus* und *M. rotula* wurden durch einen solchen Zusatz nicht beeinflusst. In den Reihen mit *M. chordalis* war die Variation so gross, dass es als unsicher angesehen werden muss, ob eine Zn-Wirkung vorlag. Die übrigen Arten, *M. putillus*, *M. foetidus* und *M. ramealis* sowie insbesondere *M. peronatus*, *M. scorodonius*, *M. epiphyllus* und *M. graminum*, wuchsen in den Reihen mit Zn-Zusatz wesentlich besser als in der Kontrollreihe.

b. *Zink als wachstumsbegrenzender Faktor.*

Nachdem ich gefunden hatte, dass Zn wenigstens bei gewissen *Marasmius*-Arten das Myzelwachstum stark fördert, beschloss ich, die Wirkung des Metalls vom quantitativen Gesichtspunkt zu studieren und dabei von einer analogen Fragestellung auszugehen wie bei meinen Untersuchungen über die quantitative Wirkung der Wuchsstoffe: Kann in Anwesen-

heit einer gewissen Quantität Zn bloss eine gewisse, durch diese Quantität bestimmte Myzelmenge gebildet werden?

Wenn Zn für das Wachstum der Pilze notwendig ist, und wenn diese während ihres Wachstums das Metall im Myzel binden, muss der Gehalt der Nährlösung an dem Metall allmählich abnehmen. Reguliert man die übrigen Faktoren so, dass sie das Wachstum nicht wesentlich begrenzen, so muss dieses schliesslich infolge von Zn-Mangel aufhören. Vorausgesetzt, dass eine durch diese Ursache bewirkte Wachstumshemmung das Myzel nicht ernstlich schädigt, muss dieses nach erneutem Zusatz von Zn das Wachstum wieder aufnehmen können. Es muss also möglich sein, die quantitative Wirkung des Metalls auf die Pilze dadurch zu studieren, dass man die Wachstumskurven derselben in Lösungen feststellt, welche suboptimale Mengen Zn enthalten.

Als Objekt für diese Untersuchungen wählte ich *M. scorodonius*, der schon bei meinen ersten Versuchen stark auf einen Zusatz von Zn reagiert hatte.

In erster Linie handelte es sich um die Entscheidung, ob das Wachstum des Pilzes in einer Zn-armen Nährlösung überhaupt aufhört, weil das Metall verbraucht wird. Danach sollte festgestellt werden, wie grosse (suboptimale) Zn-Mengen der Nährlösung zugesetzt werden müssten, damit der quantitative Effekt des Metalls am besten studiert werden könnte. In Versuch 38 züchtete ich deshalb den Pilz in einer aus gereinigten Chemikalien bereiteten Nährlösung, der ich auch Zn in Konzentrationen von 0,002 γ—20 γ je 20 ccm Lösung zusetzte.

Versuch 38. Der Einfluss verschiedener Zinkmengen auf das Wachstum von Marasmius scorodonius A (Tab. 50, Fig. 21).

Nährlösung:

Glykose	10	g
Asparagin	1	g
KH_2PO_4	0,5	g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5	g
$FeCl_3$-Lösung (Fe-Konz. 1/500)	0,5	ccm
Aneurin	50	γ
H_2O (dreimal dest.)	1000	ccm

Der Versuch umfasste 6 Reihen (siehe Tab. 50). 6 Parallelkolben.

Das Myzeltrockengewicht betrug in der Kontrollreihe nach 35 Tagen 6,5 mg. Während der folgenden 30 Tage nahm es auf 8,1 mg zu. Das Wachstum verlief also im späteren Teil des Versuchs äusserst langsam, hörte aber, solange der Versuch dauerte, nicht definitiv auf.

Ein Zusatz von 0,002 γ Zn je Kolben hatte keinen deutlichen Einfluss auf das Wachstum des Pilzes. Auch unterschieden sich die Wachstums-

Tabelle 50.

Der Einfluss verschiedener Zinkmengen auf das Wachstum von *Marasmius scorodonius* A (Versuch 38).

Versuchszeit in Tagen	Myzel-Trockengewicht in mg					
	Kein Zn-Zusatz	0,002 γ Zn je Kolben	0,02 γ Zn je Kolben	0,2 γ Zn je Kolben	2 γ Zn je Kolben	20 γ Zn je Kolben
15	3,5 ± 0,4	4,0 ± 0,5	3,8 ± 0,4	3,9 ± 0,1	6,4 ± 0,5	5,3 ± 0,8
25	5,2 ± 0,4	4,6 ± 0,5	5,9 ± 0,7	5,8 ± 0,2	7,2 ± 0,4	11,6 ± 1,1
35	6,5 ± 0,7	7,5 ± 0,3	7,7 ± 0,7	7,6 ± 1,0	13,6 ± 0,6	32,2 ± 1,0
45	6,9 ± 0,4	7,5 ± 0,4	9,0 ± 0,3	10,2 ± 0,3	19,2 ± 1,9	41,3 ± 2,5
55	7,8 ± 0,8	8,6 ± 0,6	9,3 ± 0,6	10,1 ± 0,3	19,6 ± 2,0	43,5 ± 1,2
65	8,1 ± 0,1	8,3 ± 0,2	10,0 ± 0,4	10,5 ± 0,5	21,9 ± 1,5	47,8 ± 2,8

End.-pH: 4,0–4,6.

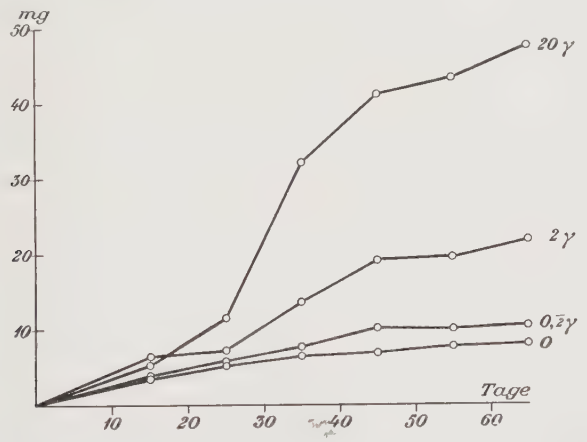

Fig. 21. Der Einfluss verschiedener Zinkmengen auf das Wachstum von *Marasmius scorodonius* A (Versuch 38).

kurven des Pilzes in den Reihen mit 0,02 γ und 0,2 γ Zn je Kolben während der ersten 35 Versuchstage nicht sicher von der Kontrollkurve. Im späteren Teil des Versuchs war jedoch die Myzelerzeugung in diesen Reihen etwas grösser als in der Kontrolle. In der Reihe mit 2 γ Zn je Kolben war die Wachstumsgeschwindigkeit vom Beginn des Versuches an grösser als in den Reihen mit schwächeren Zn-Konzentrationen. In der Reihe mit 20 γ Zn je Kolben endlich lag die Wachstumskurve für den Pilz ihrerseits erheblich höher als die Kurve für die 2 γ-Reihe.

Der Versuch lieferte keine deutliche Antwort auf die Frage, ob das Wachstum des Pilzes in einer Zn-armen Nährlösung allmählich infolge von Zn-Mangel aufhört. Die Resultate zeigen indes, dass man beim Studium der Wirkung suboptimaler Zn-Mengen auf *M. scorodonius* das Metall in Mengen von ungefähr 1 γ je Kolben zusetzen muss. In Verbindung mit Versuch 36 zeigt Versuch 38 auch, dass eine Zn-Konzentration von 20 γ je Kolben (1 mg je Liter) ungefähr dem Optimum für diese Art entspricht. Zum Vergleich kann erwähnt werden, dass die optimale Zn-Konzentration für *Aspergillus niger* nach Roberg (1928, S. 353) und Gollmick (1936, S. 426) 1 mg je Liter ist, während Steinberg (1935 b, S. 414) 0,14 mg je Liter angibt.

Es ist denkbar, dass bei Versuch 38 eine gewisse Auslösung von Zn aus den Wänden der Kolben stattfand, und dass dies die Ursache war, dass das Wachstum nicht definitiv aufhörte. Um diese Frage zu untersuchen, verglich ich das Wachstum des Pilzes in Kolben aus Jenaer Geräteglas 20 und aus Quarz. Da es ja auch möglich erschien, dass deutlichere Resultate mit einem neu isolierten Stamm des Pilzes erhalten werden könnten, benutzte ich für diese Untersuchung den zu dem betreffenden Zeitpunkt neu isolierten Stamm B.

Versuch 39. Das Wachstum von Marasmius scorodonius B in zinkarmer Nährlösung in Kolben aus Jenaer Geräteglas 20 und aus Quarz (Tab. 51, Fig. 22).

Nährlösung wie in Versuch 38.
Reihen:

I. Nährlösung ohne Zn-Zusatz in Kolben aus Quarz.
II. Nährlösung mit Zusatz von 1 mg Zn je Liter in Kolben aus Quarz.
III. Nährlösung ohne Zn-Zusatz in Kolben aus Jenaer Geräteglas 20.

8 Parallelkolben.
Fig. 22 stellt die Wachstumskurven der Reihen I und II dar.

Das Wachstum in den Reihen ohne Zn-Zusatz ging wie bei Versuch 38 sehr langsam vonstatten. Ein sicherer Unterschied zwischen der Reihe, wo der Pilz in Glaskolben gezüchtet wurde, und der, bei welcher Quarzkolben verwendet wurden, bestand nicht. Eine Auslösung von Zn aus den Wänden der Glaskolben kann also während des Versuchs nicht stattgefunden haben. Bei solchen Untersuchungen wie den hier in Rede stehenden sind deshalb Kolben aus Jenaer Geräteglas 20 Quarzkolben gleichwertig (vgl. Bortels 1927, S. 307, und Roberg 1928, S. 347).

Auch bei Versuch 39 hörte das Wachstum des Pilzes in der Lösung ohne Zn-Zusatz nicht endgültig auf. Nach 65 Tagen wuchs der Pilz jedoch äusserst langsam, und ich setzte deshalb nach 88 Tagen in gewissen Kolben einen Überschuss von Zn zu, in andern Asche-Lösung (vgl. Versuch 23)

Tabelle 51.

Das Wachstum von *Marasmius scorodonius* B in zinkarmer Nährlösung in Kolben aus Jenaer Geräteglas 20 und aus Quarz (Versuch 39).

Versuchszeit in Tagen	Myzel-Trockengewicht in mg		
	Glaskolben	Quarzkolben	
	Kein Zn-Zusatz	Kein Zn-Zusatz	20 γ Zn je Kolben
15	2,6 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,9 ± 0,4
30	4,2 ± 0,2	4,5 ± 0,3	11,1 ± 0,8
45	6,5 ± 0,4	7,4 ± 0,4	21,4 ± 0,9
65	8,6 ± 0,5	9,5 ± 0,4	40,0 ± 1,0
85	9,3 ± 0,3	9,8 ± 0,3	44,3 ± 0,7
103	10,0 ± 0,5	11,6 ± 0,3	—
88 + 15	14,8 ± 0,5[1]	14,2 ± 1,6[1]	—
88 + 15	20,2 ± 1,2[2]	20,0 ± 0,5[2]	—
88 + 15	28,1 ± 0,9[3]	32,6 ± 2,5[3]	—

End-pH: 3,8–4,6.

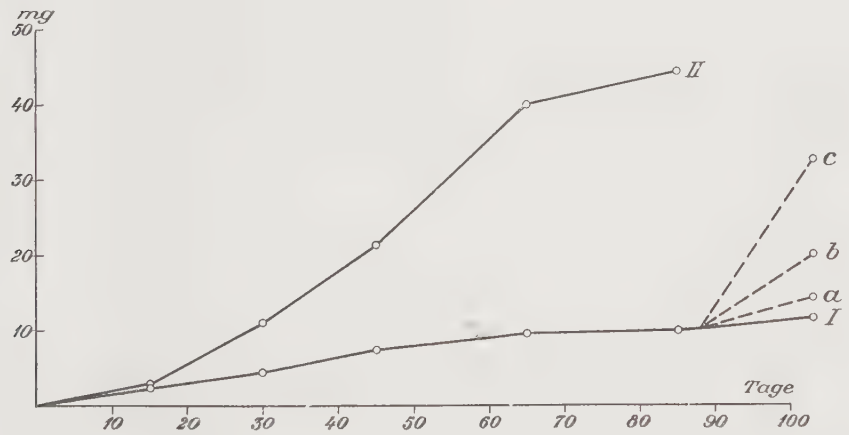

Fig. 22. Der Einfluss von Zink auf *Marasmius scorodonius* B bei Züchtung in Quarzkolben. *I* kein Zn-Zusatz, *II* Zusatz von 20 γ Zn je Kolben. *a*, *b* und *c* Wachstum nach Zusatz von 40 γ Zn, 0,04 ccm Asche-Lösung bzw. 40 γ Zn + 0,04 ccm Asche-Lösung je Kolben (Versuch 39).

[1] 4 Kolben, zu denen nach 88 Tagen je 1 ccm H_2O mit 40 γ Zn gesetzt wurde.

[2] 4 Kolben, zu denen nach 88 Tagen je 1 ccm H_2O mit 0,04 ccm Asche-Lösung (siehe Versuch 23, S. 117) gesetzt wurde.

[3] 4 Kolben, zu denen nach 88 Tagen je 2 ccm H_2O mit 40 γ Zn und 0,04 ccm Asche-Lösung gesetzt wurden.

und in einer dritten Gruppe sowohl Zn als Asche. Als die Myzelien in diesen Kolben nach weiteren 15 Tagen geerntet wurden, zeigte sich, dass der Zn-Zusatz eine gewisse, wenngleich ziemlich geringe Wachstumssteigerung bewirkt hatte. Der Aschenzusatz hatte eine etwas stärkere Wirkung. Zusammen verursachten Asche und Zn eine sehr starke Beschleunigung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes wurde also bei diesem Versuch (und dem vorhergehenden) nicht bloss durch die niedrige Zn-Konzentration begrenzt, sondern auch durch den geringen Gehalt der Nährlösung an gewissen anderen, in der Asche-Lösung enthaltenen Metallen. Damit die Untersuchung über den Einfluss von Zn auf das Wachstum des Pilzes eindeutige Resultate ergeben konnte, musste offenbar die Lösung diese anderen Metalle von Anfang an enthalten.

Als die Untersuchungen über die Wirkung von Zn auf *M. scorodonius* bis zu diesem Punkt fortgeschritten waren, hatte ich bei meinen früher besprochenen Studien über Ca und Mn gefunden, dass diese beiden Metalle wichtige Wachstumsfaktoren für die Pilze sind. In Versuch 40 wurde deshalb *M. scorodonius* in derselben Nährlösung gezüchtet, die bei den Versuchen 38 und 39 angewandt worden war, ergänzt durch Ca und Mn. Zn wurde in suboptimalen Mengen zugesetzt, nämlich 0,5 und 1 γ je Kolben.

Versuch 40. Der Einfluss suboptimaler Zinkmengen auf das Wachstum von Marasmius scorodonius B in einer Nährlösung, die ausser den gewöhnlichen Nährstoffen auch Kalzium und Mangan enthielt (Tab. 52, Fig. 23).

Nährlösung: Wie in Versuch 38 mit Zusatz von 100 mg $CaSO_4 . 2H_2O$ und 10 mg $MnSO_4 . 4H_2O$ je Liter.

Reihen: a) Kein Zn-Zusatz.
b) 0,5 γ Zn je Kolben.
c) 1 γ Zn je Kolben.

6 Parallelkolben.

Der Pilz wuchs in der Kontrollreihe dieses Versuchs erheblich rascher als in den entsprechenden Reihen der Versuche 38 und 39. Nach 40 Tagen betrug das Myzeltrockengewicht ca. 10 mg. Danach kam das Wachstum indes zum Stillstand. In den Reihen mit 0,5 und 1 γ Zn je Kolben hatten sich nach 50 Tagen 17 bzw. 22 mg Myzel gebildet. Auch in diesen Reihen hörte danach das Wachstum auf. Ein Zusatz von Zn im Überschuss (20 γ je Kolben) hatte in allen drei Reihen zur Folge, dass das Myzel wieder rasch zu wachsen begann. Im Verlauf von 15 Tagen nahm nämlich das Myzeltrockengewicht in den betreffenden Reihen nach einem solchen Zusatz um 12, 16 bzw. 15 mg zu.

Der Versuch zeigte deutlich, dass Zn ein für *M. scorodonius* notwendiges Element ist. Eine gewisse Quantität Zn gestat-

Tabelle 52.

Der Einfluss suboptimaler Zinkmengen auf das Wachstum von *Marasmius scorodonius* B in einer Nährlösung, die ausser den gewöhnlichen Nährstoffen auch Kalzium und Mangan enthielt (Versuch 40).

Versuchszeit in Tagen	Myzel-Trockengewicht in mg		
	Kein Zn-Zusatz	0,5 γ Zn je Kolben	1 γ Zn je Kolben
10	2,8 ± 0,1	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,2
20	6,4 ± 0,3	8,4 ± 0,4	11,3 ± 0,6
30	8,7 ± 0,5	12,6 ± 0,9	16,7 ± 1,6
40	10,7 ± 1,2	15,5 ± 0,7	18,3 ± 0,6
50	10,3 ± 0,3	17,4 ± 0,5	22,0 ± 1,4
65	10,3 ± 1,0	16,0 ± 1,0	20,3 ± 0,3
50 + 15	22,0 ± 2,3[1]	—	—
65 + 15	—	32,0 ± 1,6[2]	35,4 ± 0,7[2]

End-pH: 4,5–4,6.

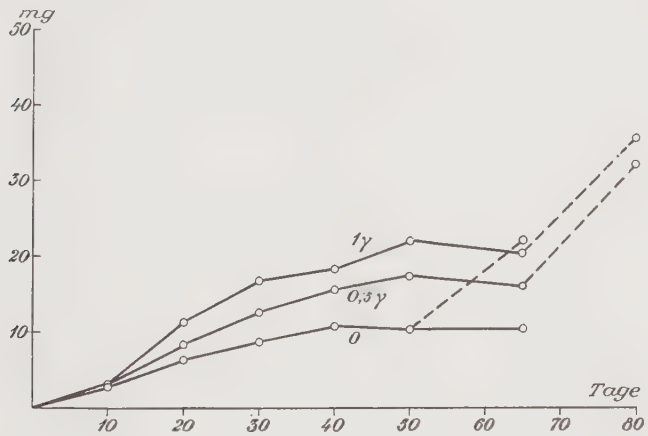

Fig. 23. Der Einfluss suboptimaler Zinkmengen auf das Wachstum von *Marasmius scorodonius* B in einer Nährlösung, die ausser den gewöhnlichen Nährstoffen auch Kalzium und Mangan enthielt. – – – – –: Wachstum nach Zusatz von 20 γ Zn je Kolben (Versuch 40).

[1] Nach 50 Tagen wurden jedem dieser (4) Kolben 5 ccm H_2O mit 20 γ Zn zugesetzt. Sämtlichen übrigen Versuchskolben wurden gleichzeitig 5 ccm H_2O zugesetzt.

[2] Nach 65 Tagen wurde jedem dieser (4) Kolben 1 ccm H_2O mit 20 γ Zn zugesetzt.

tet bloss die Bildung einer bestimmten Myzelmenge. Die Wirkung von Zn ist also quantitativ.

Die Resultate ermöglichen auch eine ungefähre Berechnung des Wirkungsgrades des Metalls. In der Kontrollreihe wurden maximal 10,7 mg Myzel gebildet, in den Reihen mit einem Zusatz von 0,5 bzw. 1 γ Zn je Kolben 17,4 bzw. 22,0 mg. 0,5 γ Zn reichten also zur Bildung von 6,7 mg und 1 γ Zn zur Bildung von 11,3 mg Myzel aus. Hieraus lässt sich der Myzel-Zink-Quotient auf 13 400 bzw. 11 300 berechnen.

Da die eben erwähnten Höchstwerte nicht absolut sicher sind, geben die berechneten numerischen Werte für den Myzel-Zink-Quotienten bloss dessen Grössenordnung an. Diese liegt also ungefähr bei $1 \cdot 10^4$, was bedeutet, dass ca. 1 γ Zn bei einer Erzeugung von 10 mg Myzel verbraucht wird.

Da ungefähr 10 mg Myzel in der Kontrollreihe erhalten wurden (vgl. auch die Versuche 38 und 39), kann die Zn-Menge in der Grundlösung und im Impfmaterial auf (maximal) ca. 1 γ je Kolben geschätzt werden. Leider war es mir nicht möglich, diese Resultate durch eine chemische Bestimmung des Zn-Gehalts der verwendeten Chemikalien zu kontrollieren.

Ob Zn auch für die übrigen *Marasmius*-Arten ein notwendiges Element ist, lässt sich auf Grund der hier mitgeteilten Untersuchungen nicht entscheiden. Jedoch halte ich es für wenig wahrscheinlich, dass sich die Pilze in dieser Beziehung verschieden verhalten. Wenn Zn ein für sämtliche Arten notwendiges Element ist, müssen indes die Resultate von Versuch 37 so gedeutet werden, dass der Myzel-Zink-Quotient bei verschiedenen Arten verschieden gross ist, und dass *M. scorodonius* im Vergleich mit der Mehrzahl der übrigen *Marasmius*-Arten einen besonders grossen Zn-Bedarf hat.

c. *Die Abhängigkeit der Hemmungswirkung höherer Zinkkonzentrationen von der Wasserstoffionenkonzentration.*

Im Zusammenhang mit gewissen vorbereitenden Untersuchungen über das Wachstum von *Marasmius graminum* in verschiedenen Nährlösungen stellte ich in einem Versuch auch die Wachstumskurve für diesen Pilz in Nährlösung A mit und ohne Zusatz von 1 mg Zn je Liter fest.

Versuch 41. Das Wachstum von Marasmius graminum in Nährlösung A mit und ohne Zn-Zusatz (Tab. 53, Fig. 24).

Nährlösung A mit Zusatz von 50 γ Aneurin je Liter.

Reihen: I. Kein Zn-Zusatz.
II. Zusatz von 1 mg Zn (als $ZnSO_4 . 7 H_2O$) je Liter.

Nach 33 Tagen wurden zu 6 Kolben von Reihe II 10 ccm steriles, zweimal destilliertes H_2O und zu 6 andern Kolben derselben Reihe 2 ccm zweimal dest. H_2O + 8 ccm 1/15 mol. Na_2HPO_4-Lösung gesetzt. Durch den letztgenannten Zusatz wurde

Tabelle 53.

Das Wachstum von *Marasmius graminum* in Nährlösung A mit und ohne Zusatz von Zink (Versuch 41).

Versuchszeit in Tagen	Kein Zn-Zusatz		1 mg Zn je Liter	
	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓	Trockengewicht mg	pH: 5,5 ↓
10	13,9	5,1	16,5	4,9
20	27,3	4,7	55,9	4,3
30	33,1	4,4	54,0	4,2
40	45,5	4,3	—	—
50	59,2	4,2	—	—
60	84,7	3,9	—	—
85	98,6	3,8	—	—
33 + 10[1]	—	—	73,6	4,1
33 + 10[2]	—	—	123,0	5,5

Fig. 24. Das Wachstum von *Marasmius graminum* in Nährlösung A mit und ohne Zn-Zusatz. *I* kein Zn-Zusatz, *II* Zusatz von 20 γ Zn je Kolben. *a* und *b* Wachstum nach Zusatz von 10 ccm H_2O bzw. 8 ccm 1/15 mol. Na_2HPO_4-Lösung + 2 ccm H_2O (Versuch 41).

[1] Nach 33 Tagen wurden zu jedem dieser (6) Kolben 10 ccm H_2O gesetzt.

[2] Nach 33 Tagen wurden zu jedem dieser (6) Kolben 8 ccm 1/15-mol. Na_2HPO_4-Lösung + 2 ccm H_2O gesetzt. Hierdurch wurde das pH auf 6,6 gebracht.

das pH der Lösung von 4,3 auf 6,6 verschoben. In der Reihe I wurden nach 60 Tagen 10 ccm zweimal dest. H_2O je Kolben zugesetzt.

Während des früheren Teils des Versuchs war die Wachstumsgeschwindigkeit in der Zn-Reihe grösser als in der Reihe ohne Zn-Zusatz, aber nachdem sich das pH in der Zn-Reihe auf ca. 4,3 verschoben hatte, hörte das Wachstum in dieser Reihe auf. Nachdem das pH durch Zusatz von sek. Na-Phosphat auf 6,6 erhöht worden war, kam das Wachstum wieder in Gang. In der Reihe ohne Zn-Zusatz hörte das Wachstum während des Versuchs nicht auf, weshalb das Myzeltrockengewicht schliesslich das in der Zn-Reihe überstieg. Das pH verschob sich in der Reihe ohne Zn-Zusatz schliesslich auf 3,8.

Zwischen der Wachstumshemmung in der Zn-Serie und der erhöhten Wasserstoffionenkonzentration muss ein Zusammenhang bestehen. Da der Pilz in der Reihe ohne Zn-Zusatz einen so niedrigen pH-Wert wie 3,9 vertrug, kann es indes in der Zn-Reihe nicht die erhöhte Wasserstoffionenkonzentration an und für sich gewesen sein, welche hemmend wirkte. Vielmehr war es vermutlich das Zn, welches bei dem fraglichen pH-Wert das Wachstum des Pilzes hemmte. Diese Annahme steht auch gut mit der Tatsache in Einklang, dass das Myzel durch Verdünnung der Lösung wieder zum Wachsen gebracht werden konnte. Als das pH der Lösung ausserdem auf optimalen Wert erhöht wurde, begann das Myzel wieder mit ungemein grosser Schnelligkeit zu wachsen.

Auch in der Literatur finden sich Angaben, die auf einen Zusammenhang zwischen der Zn-Wirkung und der Wasserstoffionenkonzentration deuten. So sagt Bortels (1927, S. 310), dass die „Selbstvergiftung", die beim Wachsen von *Aspergillus niger* in physiologisch sauren Medien eintritt, „besonders dann sehr auffällig war, wenn die Nährlösungen reichliche Mengen Zink enthielten". Bortels nimmt an, dass Zn aus physiologisch sauren Stickstoffquellen schnell und reichlich den Säurerest frei macht, und dass die Wachstumshemmung nur eine Folge der erhöhten Wasserstoffionenkonzentration ist: „Die in Wahrheit fördernde Wirkung des Zinks wurde also durch diese Säurevergiftung verdeckt" (l. c. S. 316–317).

Versuch 41 zeigt indes, dass Zn wenigstens bei *Marasmius graminum* nicht in dieser Weise wirkt. Im Verhältnis zur Myzelerzeugung war nämlich die pH-Verschiebung in der Zn-Reihe nicht stärker als in der Reihe ohne Zn-Zusatz. Auf diesen Pilz scheint Zn bei niedrigeren pH-Werten in Konzentrationen hemmend zu wirken, die bei höheren pH-Werten keinen solchen Einfluss haben (vgl. Tamiya 1928, S. 100).

Diese Resultate wurden durch Versuch 42 bestätigt, wo die Wirkung von Zn in den Konzentrationen 1 und 4 mg je Liter bei verschiedenen pH-Werten studiert wurde.

Versuch 42. Der Einfluss von Zink auf das Wachstum von Marasmius graminum bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen (Tab. 54).

Nährlösung: Wie in Versuch 22, aber ohne Zusatz von Ca. Zn wurde in den Konzentrationen 1 und 4 mg je Liter zugesetzt und das pH durch Zusatz von Phosphatpuffer variiert. Der Versuch wurde gleichzeitig mit den Versuchen 22 und 29 ausgeführt, und die Reihe mit 1 mg Zn je Liter ist identisch mit der Ca-freien Reihe von Versuch 29.

Tabelle 54.

Der Einfluss von Zink auf das Wachstum von *Marasmius graminum* bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen (Versuch 42).

Anf.-pH	1 mg Zn je Liter		4 mg Zn je Liter	
	End-pH	Trockengewicht mg	End-pH	Trockengewicht mg
2,9	2,9	0,1 ± 0,0	2,9	0,1 ± 0,0
3,3	3,2	0,4 ± 0,0	3,2	0,3 ± 0,0
3,7	3,7	6,4 ± 0,3	3,7	2,8 ± 0,2
4,3	4,3	34,4 ± 2,3	4,3	17,0 ± 0,7
4,8	5,1	60,4 ± 2,0	5,1	26,2 ± 1,0
6,0	5,8	108,6 ± 1,4	5,9	100,9 ± 2,2
6,9	6,7	108,5 ± 1,7	6,7	107,4 ± 1,3
7,8	6,8	100,9 ± 1,7	6,8	101,1 ± 0,7

Bei neutraler oder anfangs schwach alkalischer Reaktion hatten die beiden Zn-Konzentrationen dieselbe Wirkung auf den Pilz. In sauren Lösungen hatte dagegen die Zn-Konzentration 4 mg je Liter eine deutlich hemmende Wirkung im Vergleich mit der Zn-Konzentration 1 mg je Liter.

Die Versuche 41 und 42 zeigen, dass die hemmende Wirkung, welche höhere Zn-Konzentrationen auf *M. graminum* ausüben, von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist und mit dieser zunimmt. Indes ist zuzugeben, dass die Hemmungswirkung des Zn-Zusatzes 1 mg je Liter in Versuch 41 bei einem pH-Wert eintrat, bei dem der Pilz in Versuch 42 nicht so stark auf denselben Zn-Zusatz reagierte. Für den Unterschied dieser beiden Versuchsresultate sind mehrere Ursachen denkbar. Die Myzelerzeugung war in Versuch 41 relativ weit fortgeschritten, bevor sie aufhörte, und es kann nicht als ausgeschlossen angesehen werden, dass der Pilz unter dem Einfluss von Zn gewisse Stoffwechselprodukte bildete, die schliesslich dazu beitrugen, das Wachstum zu hemmen. Auch ist es möglich, dass der Zn-Gehalt der Grundlösung bei den einzelnen Versuchen etwas variierte,

oder dass die Empfindlichkeit des Pilzes bei verschiedenen Gelegenheiten verschieden gross war. Das Hauptresultat der Untersuchung wird indes durch diese Unregelmässigkeiten nicht berührt.

d. *Zusammenfassung der Resultate der Untersuchungen über die Zinkwirkung.*

In einer synthetischen Nährlösung, die mit Zn versetzt ist, wachsen viele *Marasmius*-Arten schneller als in derselben Nährlösung ohne Zn-Zusatz. Die einzelnen Arten reagieren indes sehr verschieden stark auf Zn. Bei *M. peronatus* und *M. scorodonius* ist die Reaktion am deutlichsten. Bei der letztgenannten Art tritt eine sehr deutliche Zn-Wirkung bei einer Konzentration von 100 γ je Liter hervor. Bei genügend langer Versuchsdauer ist auch ein gewisser Zn-Effekt bei einer Zn-Konzentration von 10 γ je Liter zu beobachten. Das Optimum liegt ungefähr bei der Konzentration 1 mg je Liter. Die Übereinstimmung mit *Aspergillus niger* ist in der letztgenannten Hinsicht ziemlich gut (S. 158).

Wenn die Nährlösung mit optimalen Mengen Ca und Mn versetzt ist, tritt bei *M. scorodonius* in Zeitversuchen eine quantitative Wirkung suboptimaler Zn-Mengen sehr deutlich hervor: Sowohl in der Kontrollreihe (kein Zn-Zusatz) als in den Reihen, in denen suboptimale Zn-Mengen zugesetzt wurden, hört das Wachstum allmählich infolge von Zn-Mangel auf. Nach Zusatz von Zn im Überschuss beginnt der Pilz wieder zu wachsen. Zwischen der zugesetzten Zn-Menge und der maximal gebildeten Trockensubstanz herrscht Proportionalität. Man kann einen Myzel-Zink-Quotienten berechnen, dessen Grössenordnung für *M. scorodonius* $1 \cdot 10^4$ beträgt, d. h. für die Bildung von 1 mg Myzeltrockensubstanz wird ca. 0,1 γ Zn verbraucht. Zn ist also absolut notwendig für das Wachstum dieses Pilzes, und seine Wirkung besteht nicht nur darin, dass das Wachstum beschleunigt wird. Eine solche quantitative Wirkung von Zn ist bisher bei Pilzen oder anderen Pflanzen nicht nachgewiesen worden.

Ob Zn auch für die übrigen *Marasmius*-Arten notwendig ist, wurde nicht untersucht. Wenn dies der Fall ist, was man für wahrscheinlich halten muss, so haben indes die verschiedenen Arten einen verschieden grossen Zn-Bedarf.

Die Zn-Konzentration, bei der eine Hemmungswirkung eintritt, ist vom pH abhängig. Die Empfindlichkeit gegen die hemmende Wirkung supraoptimaler Zn-Mengen nimmt mit steigender Wasserstoffionenkonzentration zu. So wirkt bei *M. graminum* Zn in sauren Lösungen hemmend bei Konzentrationen, die bei neutraler Reaktion (optimaler Wasserstoffionenkonzentration) die Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes nicht herabsetzen.

IV. Ökologische Gesichtspunkte.

Bei einem Rückblick auf die Ergebnisse der Untersuchung stellt sich die Frage ein, inwieweit die hier behandelten *Marasmius*-Arten als Vertreter der streuzersetzenden Hymenomyzeten sich durch ihre physiologischen Eigenschaften von anderen ökologischen Gruppen der Bodenhymenomyzeten unterscheiden.

Die Fähigkeit der *Marasmius*-Arten, Lignin und Zellulose abzubauen, dürfte vom ökologischen Gesichtspunkt grösste Bedeutung haben. Es ist wahrscheinlich, dass die relativ langsam wachsenden Hymenomyzeten im Wettbewerb mit rasch wachsenden Organismen in der Natur nur in begrenztem Umfang die leicht angreifbaren Kohlenstoffquellen ausnutzen können. Zellulose und Lignin dürften deshalb wesentliche Energiequellen für die streuzersetzenden Hymenomyzeten sein. In dieser Beziehung herrscht Übereinstimmung zwischen diesen Pilzen und den typischen holzzersetzenden Pilzen, was, wie bemerkt, zuerst von Falck (1923, 1930) hervorgehoben worden ist. Eine scharfe Grenze zwischen diesen beiden Gruppen besteht nicht. Unter den hier untersuchten *Marasmius*-Arten finden sich solche, die den holzzersetzenden Pilzen sehr nahe stehen. Oben wurde darauf hingewiesen, dass der auf moderndem Laubbaumholz wachsende *M. foetidus* am ehesten als ein holzzersetzender Pilz betrachtet werden kann (S. 115). Hier sei auch bemerkt, dass Myzel von *M. ramealis* von mir aus Holz von *Juniperus communis* isoliert werden konnte.

Auch koprophile Hymenomyzeten bauen Lignin und Zellulose ab (Waksman & McGrath 1931, Waksman 1931). Da es sich bisher als sehr schwierig erwiesen hat, die koprophilen Hymenomyzeten unter definierten Bedingungen zu züchten, ist es vorläufig unmöglich, den ökologischen Unterschied zwischen den genannten Pilzgruppen auf bestimmte physiologische Eigenschaften zurückzuführen. Indes ist es wahrscheinlich, dass dieser Unterschied unter anderm durch ungleiche Anforderungen an Wuchsstoffe (vgl. Treschow 1943) und Stickstoffquellen bedingt ist.

Zwischen den streuzersetzenden und den bei Bäumen mykorrhizabildenden Hymenomyzeten ist der Unterschied dagegen gross, was die Deckung des Energiebedarfs betrifft. Frank (1885) nahm an, dass die Mykorrhizapilze der Bäume ihre Energienahrung von den Wurzeln erhalten. Melin (1925) wies nach, dass diese Pilze Zellulose nicht zersetzen

können und nur auf Glykose gut wachsen. Er hielt es für wahrscheinlich, dass die Pilze Zucker von den Wurzeln erhalten (l. c. S. 117). Auch Romell (1939, S. 358) vertrat die Ansicht, dass die Mykorrhizapilze für ihren Energiebedarf auf die Wirtsbäume angewiesen sind. Im Jahre 1942 konnte Björkman experimentell nachweisen, dass die Mykorrhizabildung bei Kiefer und Fichte dadurch bedingt ist, dass die Wurzeln einen Überschuss löslicher Kohlenhydrate enthalten, die der Pilzsymbiont ausnutzen kann.

Das Verhalten der Pilze zu NH_3- und NO_3-Stickstoff dürfte gleichfalls von gewisser ökologischer Bedeutung sein. Aus Hesselmans (1926) Untersuchungen geht nämlich hervor, dass Nitrate in gewöhnlicher Waldstreu nicht in nennenswerten Mengen enthalten sind.

Die Empfindlichkeit der *Marasmius*-Arten gegen die Wasserstoffionenkonzentration des Mediums dürfte eine grosse Rolle für ihr Vorkommen auf verschiedenen Substraten in der Natur spielen. Meine Untersuchungen ergaben, dass das pH-Optimum für die typischen Nadelpilze zwischen 4 und 5 liegt, während das Optimum für Arten, die ausserdem auf Laubstreu vorkommen oder ganz auf dieses Substrat beschränkt sind, bei niedrigeren Wasserstoffionenkonzentrationen liegt. Die Übereinstimmung zwischen den experimentell festgestellten Optima und den für die natürlichen Substrate der Pilze charakteristischen pH-Werten war eine gute (vgl. S. 111 ff.).

Durch Untersuchungen über den Bedarf der Hymenomyzeten an Wuchsstoffen hat man festgestellt, dass Aneurinheterotrophie eine bei diesen Pilzen sehr allgemein vorkommende Eigenschaft ist. In dieser Hinsicht unterscheiden sich deshalb die streuzersetzenden Hymenomyzeten nicht von anderen ökologischen Gruppen (vgl. u. a. Fries 1938, Melin u. Mitarb. 1939, 1940, 1941, 1942). Die Humusdecke enthält nach Melin & Norkrans (1942) erhebliche Mengen Aneurin, und es ist deshalb nicht wahrscheinlich, dass die Aneurinheterotrophie für die Ökologie der verschiedenen Gruppen von Bodenhymenomyzeten bestimmend ist.

Die ökologische Bedeutung des Bedarfs der Pilze an den Metallen Ca, Mn und Zn ist sehr schwer zu beurteilen. Ob Mn und Zn in der Natur in so geringen Mengen vorkommen, dass sie begrenzende Faktoren für das Wachstum der streuzersetzenden Hymenomyzeten sind, lässt sich zur Zeit nicht entscheiden. Dass Ca eine gewisse ökologische Rolle spielen könnte, ist von vornherein nicht unwahrscheinlich. Ein Vergleich zwischen der Bedeutung der genannten Metalle für die Streuzersetzer und für die übrigen ökologischen Hymenomyzetengruppen ist gegenwärtig nicht möglich, da man der Bedeutung der Metalle für das Wachstum der Hymenomyzeten bloss geringe Aufmerksamkeit gewidmet hat.

Die ökologische Bedeutung der hier experimentell festgestellten physiologischen Eigenschaften der *Marasmius*-Arten ist also in gewissen Beziehungen klar, lässt sich aber in anderen Hinsichten zur Zeit nicht sicher beurteilen. Es liegt auf der Hand, dass weitere Untersuchungen über die Physiologie der Pilze sowie allseitige und exakte Studien über die natürlichen Standortbedingungen erforderlich sind, damit die Ökologie der Pilze vollständiger vom physiologischen Gesichtspunkt erklärt werden kann.

Summary.

The purpose of the present work is to throw light upon certain physiological aspects of litter-decomposing hymenomycetes. A number of *Marasmius*-species have been selected to represent the fungi under consideration — the majority belonging to the commonest hymenomycetes to be found in the Swedish coniferous and deciduous forests. The work firstly deals with the decomposition of litter by the fungi, in particular their effect on lignin and cellulose, and, secondly, examines the conditions for their growth. In this latter section, special attention has been devoted to the dependence of the fungi on growth substances, and to the conditioning of their growth by the concentration of hydrogen-ions and by the content of the metals calcium, manganese, and zinc in the medium.

1. The test-material comprised pure cultures of the following species: *Marasmius alliaceus* Fr., *M. androsaceus* Fr., *M. chordalis* Fr., *M. epiphyllus* Fr., *M. foetidus* Fr., *M. fulvobulbillosus* O. R. Fr., *M. graminum* Berk. & Br., *M. oreades* Fr., *M. perforans* Fr., *M. peronatus* Fr., *M. putillus* Fr., *M. ramealis* Fr., *M. rotula* Fr., and *M. scorodonius* Fr. (Table 1).

2. The capacity of the *Marasmius*-species to decompose litter was investigated by cultivating the fungi for from 6 to 7 months on different types of sterilized litter (pine-needles, beech-leaves, aspen-leaves, straw derived from *Glyceria maxima*), whose dry-weight, as well as content of lignin, cellulose, and furfural-yielding substances, were determined at the beginning and at the end of the test-period (Tables 11 & 12).

3. A more or less extensive decomposition of lignin could be established in the case of all species except *M. chordalis*. The strongest decomposition of lignin was brought about on pine-needles (48 to 59 per cent) by *M. putillus*, *M. scorodonius*, *M. peronatus*, and *M. androsaceus*; on beech-leaves (67 to 72 per cent) by *M. alliaceus*, *M. foetidus*, and *M. ramealis*; and on straw (63 per cent) by *M. oreades*.

4. Cellulose was decomposed by all species. Particularly strong decomposition of cellulose resulted when beech-leaves, aspen-leaves, or straw formed the substrate. Several of the fungi decomposed 80 to 90 per cent of the cellulose contained in these types of litter. The cellulose in pine-needles seems more difficult to attack; here, decomposition in no case exceeded 36 per cent.

5. The furfural-yielding substances were extensively decomposed by all species.

6. It was found that NH_3-nitrogen and organic nitrogen can be assimilated by all species, but NO_3-nitrogen by *M. fulvobulbillosus* only (Table 14).

7. The *Marasmius*-species are heterotrophic for thiamin (aneurin). With *M. alliaceus*, *M. androsaceus*, *M. foetidus*, *M. perforans*, *M. peronatus*, *M. putillus*, *M. ramealis*, *M. rotula*, and *M. scorodonius* the thiamin can be replaced by equivalent quantities of pyrimidine and thiazole; with *M. fulvobulbillosus* by pyrimidine only. *M. chordalis* and *M. epiphyllus*, as well as *M. graminum*, can assimilate a synthetic nutrient solution where pyrimidine alone is present; but growth is then slower than if the solution has been furnished with corresponding amounts of thiamin or pyrimidine plus thiazole (Table 19).

8. Experiments with sub-optimal quantities of thiamin showed that, under the given experimental conditions, the inability to synthesize one or both of the thiamin components is absolute in the following species: *M. androsaceus*, *M. chordalis*, *M. epiphyllus*, *M. foetidus*, *M. perforans*, *M. putillus*, *M. rotula*, and *M. scorodonius*. In certain circumstances, *M. fulvobulbillosus*, *M. graminum*, *M. peronatus*, and *M. ramealis* would seem able to adapt themselves to a certain autotrophy for thiamin (Tables 25 & 26; figs. 6, 7 & 8).

9. The content of Ca and Mn in the nutrient solution has great influence on the size of the mycelium-thiamin quotient (Table 25; fig. 6).

10. *M. androsaceus* is heterotrophic for biotin. With very weak concentrations of biotin (less than 1 mγ per 20 ml of nutrient solution), the effect of this substance is quantitative. It was possible to establish a mycelium-biotin quotient of the approx. magnitude $4 \cdot 10^6$ (Table 29; fig. 11). Given a concentration of biotin of approx. 2 mγ per 20 ml of nutrient solution, possibilities of growth are apparently unlimited, even though the rate of growth is comparatively slow. With higher concentrations of biotin, the rate of growth is accelerated until the maximum effect is obtained with a concentration of approx. 10 mγ per 20 ml of nutrient solution (Table 27; fig. 9). These results were taken to indicate that, in all circumstances, biotin exerts a quantitative influence, but that in specific conditions the fungus becomes capable of producing this vitamin itself.

11. *M. perforans* displayed an interesting ability to adapt itself to certain synthetic thiamin-containing media. During the first 4 to 8 weeks, the rate of growth was extremely slow, but accelerated considerably afterwards. This was taken to indicate that the capacity of the fungus to synthesize certain necessary growth substances is reduced when it lives

on natural substrates, but that this capacity increases when it is cultivated on the above synthetic media for a long period. The substances concerned are not thiamin or biotin, but some other non-identified growth substances (Tables 20 & 23; figs. 3 & 4).

12. The influence of the hydrogen-ion concentration on the rate of growth of the fungi was studied by employing a nutrient solution which, as its source of nitrogen, contained asparagine, and whose pH was regulated by adding SÖRENSEN's phosphate solutions. In such conditions, the fungi grow with relatively slight changes in the pH (Table 33, figs. 13—15). The correspondence between the experimentally established pH-optima and the pH-values characteristic of the substrates natural to the fungi was rather good.

13. For maximum rate of growth in acid media most species are dependent on Ca; a particularly strong Ca-effect was demonstrated in the case of *M. chordalis*, *M. epiphyllus*, *M. graminum*, and *M. rotula* (Tables 35 & 37).

14. The antagonistic action of Ca towards other ions was examined more closely. No antagonism could be established between Ca and Mg (Table 40; fig. 20). In the majority of species examined, Ca exerted a definitely protective influence against supra-optimal concentrations of hydrogen-ions. With optimal concentrations of hydrogen-ions, Ca had no influence on the rate of growth of certain species (e. g. *M. graminum*, *M. rotula*), while elsewhere (*M. alliaceus*, *M. epiphyllus*) a definite influence of the metal was observable even when the pH had an optimal value (Tables 44 & 45). Ca also exercises a clearly protective influence against higher concentrations of various alkali-salts (Table 43). Ca can be at least partly replaced by Sr (Table 47).

15. Zn is indispensable for the growth of *M. scorodonius*. A given quantity of Zn only permits the growth of a definite amount of mycelium, the influence of this metal thus being quantitative (Table 52; fig. 23). For *M. scorodonius*, a mycelium-zinc quotient could be established, the magnitude of which was $1 \cdot 10^4$. Zn must be regarded as necessary for the other species as well, but the need of the metal seems to vary from fungus to fungus (Table 49). Sensitivity towards the inhibiting influences emanating from supra-optimal quantities of Zn increases with higher concentrations of hydrogen-ions (Table 54).

Literaturverzeichnis.

Ballion, P. 1906. Recherches sur les cercles mycéliens (Ronds de fées). — Act. Soc. Linnéenne, Bordeaux, *61* (sér. 7, tome 1): LXII–LXXXVIII.

Barthel, C. & Bengtsson, N. 1923. Bidrag till frågan om stallgödselns verkningssätt vid cellulosasönderdelningen i åkerjorden. — Medd. fr. Centralanst. f. försöksv. på jordbruksomr. *248*. Stockholm.

Bavendamm, W. 1928. Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen. — Zeitschr. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz *38*: 257–276.

—— 1936. Erkennen, Nachweis und Kultur der holzverfärbenden und holzzersetzenden Pilze. — Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. XII: 2.

Benecke, W. 1894. Ueber die mineralische Nahrung der Pflanzen, insonderheit der Schimmelpilze. — Bot. Centralbl. *60*: 195–196.

—— 1895. Die zur Ernährung der Schimmelpilze nothwendigen Metalle. — Jahrb. wiss. Bot. *28*: 487–530.

—— 1907. Spezielle Ernährungsphysiologie: Die einzelnen Nährstoffe. — Lafar, F., Handb. d. technischen Mykologie, *1*, Jena.

Benecke, W. & Jost, L. 1924. Pflanzenphysiologie I. Stoffwechsel. 4. Aufl. Jena.

Bengtsson, N. 1925. Bestämning av inkrusterad cellulosa i jord. (Engl. Zusammenf.) — Medd. fr. Centralanst. f. försöksv. på jordbruksomr. *279*. Stockholm.

—— 1932. Bidrag till frågan om stallgödselkvävets nitrifikation i åkerjorden. IX. Bestämning av salpeter i jord och gödsel. (Engl. Zusammenf.) — Medd. fr. Centralanst. f. försöksv. på jordbruksomr. *415*. Stockholm.

—— 1936 a. Sönderdelning av cellulosa, pentosaner och lignin i jord. Försök med stubb och rötter i sand. (Engl. Zusammenf.) — Lantbrukshögsk. Ann. *3*: 1–48. Uppsala.

—— 1936 b. Pentosanbestämning i nitrat- och nitrithaltiga prov. (Engl. Zusammenf.) — Lantbrukshögsk. Ann. *3*: 169–178. Uppsala.

—— 1938. On the determination of lignin by the thioglycolic acid method. — Lantbrukshögsk. Ann. *5*: 61–69. Uppsala.

Bertrand, G. 1912 a. Sur le rôle capital du manganèse dans la formation des conidies de l'*Aspergillus niger*. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *154*: 381–383.

—— 1912 b. Extraordinaire sensibilité de l'*Aspergillus niger* vis-à-vis du manganèse. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *154*: 616–618.

Bertrand, G. & Javillier, M. 1911 a. Influence du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *152*: 225–228.

—— 1911 b. Influence combinée du zinc et du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *152*: 900–902.

—— 1911 c. Influence du zinc et du manganèse sur la composition minérale de l'*Aspergillus niger*. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *152*: 1337–1340.

Björkman, E. 1942. Über die Bedingungen der Mykorrhizabildung bei Kiefer und Fichte. — Symb. Bot. Ups. VI: 2.

Boas, F. 1919 a. Die Bildung löslicher Stärke im elektiven Stickstoff-Stoffwechsel. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *37*: 50–56.

—— 1919 b. Untersuchungen über Säurewirkung und Bildung löslicher Stärke bei Schimmelpilzen (*Aspergillus niger*) I. — Beihefte Bot. Centralbl. *36* I: 135–185.

Boas, F. & Leberle, H. 1918 a. Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. I. — Biochem. Zeitschr. *90*: 78–95.

—— 1918 b. Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. II. – Biochem. Zeitschr. *92*: 170–187.

Bortels, H. 1927. Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen. — Biochem. Zeitschr. *182*: 301–358.

Brefeld, O. 1877. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. III. Basidiomyceten I. Leipzig.

—— 1908. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. XIV. Die Kultur der Pilze. Münster.

Brenner, W. 1920. Über die Wirkung von Neutralsalzen auf die Säureresistenz, Permeabilität und Lebensdauer der Protoplasten. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *38*: 277–285.

Burgeff, H. 1934. Pflanzliche Avitaminose und ihre Behebung durch Vitaminzufuhr. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *52*: 384–390.

Burström, H. 1934. Über antagonistische Erscheinungen bei der Kationenaufnahme des Hafers. — Svensk Bot. Tidskr. *28*: 157–263.

Buston, H. W. & Kasinathan, S. 1933. The accessory factor necessary for the growth of *Nematospora gossypii*. III. The preparation of concentrates of the second accessory factor. — Biochem. Journ. *27*: 1859–1868.

Buston, H. W. & Pramanik, B. N. 1931. The accessory factor necessary for the growth of *Nematospora gossypii*. I. The chemical nature of the accessory factor. — Biochem. Journ. *25*: 1656–1670.

Butkewitsch, W. 1902. Umwandlung der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwickelung. — Jahrb. wiss. Bot. *38*: 147–240.

Campbell, W. G. 1932 a. The chemistry of the white rots of wood. III. — Biochem. Journ. *26*: 1829–1838.

—— 1932 b. A chemical approach to the study of wood preservation. — Forestry *6*: 82–89.

Charpentier, C. A. G. 1920. Kvantitativ bestämning av jordars cellulosasönderdelande förmåga. — Medd. fr. Centralanst. f. försöksv. på jordbruksomr. *205*. Stockholm.

Czapek, F. 1913. Biochemie der Pflanzen I. 2. Aufl. Jena.

Dagys, J. 1937. Die Hefewuchsstoffe in Maiskeimlingen. — Protoplasma *28*: 205–229.

- —— 1938. Über die gebundenen Hefewuchsstoffe. — Protoplasma *31*: 524–534.

Davidson, R. W., Campbell, W. A. & Blaisdell, D. J. 1938. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. — Journ. Agr. Res. *57*: 683–695.

Duggar, B. M. 1905. The principles of mushroom growing and mushroom spawnmaking. — U. S. Dept. Agr., Bur. Plant. Ind., Bull. *85*.

Eastcott, E. V. 1928. Wildiers' bios. The isolation and identification of »bios I». — Journ. Physic. Chem. *32*: 1094—1111.

Ehrlich, F. 1927. Neue Untersuchungen über Pektinstoffe. — Zeitschr. angew. Chemie *40*: 1305–1313.

Euler, H. von & Johansson, D. 1912. Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme. IV. Über die Anpassung einer Hefe an Galaktose. — Zeitschr. physiol. Chemie *78*: 246–265.

Falck, R. 1923. Erweiterte Denkschrift über die Bedeutung der Fadenpilze für die Nutzbarmachung der Abfallstoffe zur Baumernährung im Walde und über die Möglichkeit einer nachträglichen pilzlichen Aufschliessung des Trockentorfs. — Mykol. Unters. u. Ber. *2*: 38–72.

—— 1926. Über korrosive und destruktive Holzzersetzung und ihre biologische Bedeutung. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *44*: 652–664.

—— 1930. Nachweise der Humusbildung und Humuszehrung durch bestimmte Arten höherer Fadenpilze im Waldboden. — Forstarchiv *6*: 366–377.

Falck, R. & Haag, W. 1927. Der Lignin- und der Cellulose-Abbau des Holzes, zwei verschiedene Zersetzungsprozesse durch holz-bewohnende Fadenpilze. — Ber. Deutsch. Chem. Ges. *60*: 225–232.

Farries, E. H. M. & Bell, A. F. 1930. On the metabolism of *Nematospora gossypii* and related fungi, with special reference to the source of nitrogen. — Ann. Bot. *44*: 423–455.

Fildes, P. 1924. The growth requirements of haemolytic influenza bacilli, and the bearing of these upon the classification of related organisms. — Brit. Journ. Exper. Path. *5*: 69–74.

Fischer, A. 1903. Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl. Jena.

Frank, B. 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *3*: 128–145.

—— 1888. Ueber die physiologische Bedeutung der Mycorhiza. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *6*: 248–269.

Fries, N. 1938. Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. — Symb. Bot. Ups. III: 2.

—— 1942. Über das Wuchsstoffbedürfnis einiger *Ophiostoma*-Arten. — Svensk Bot. Tidskr. *36*: 451–466.

—— 1943 a. Vitamin B_1, vitamin B_6 and biotin as growth substances for some ascomycetes. — Nature *152*: 105.

—— 1943 b. Untersuchungen über Sporenkeimung und Mycelentwicklung bodenbewohnender Hymenomyceten. — Symb. Bot. Ups. VI: 4.

—— 1943 c. Die Einwirkung von Adermin, Aneurin und Biotin auf das Wachstum einiger Ascomyceten. — Symb. Bot. Ups. VII: 2.

Fron, G. 1905. Sur les conditions de développement du mycélium de la morille. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *140*: 1187–1189.

Gaarder, T. & Hagem, O. 1919/20. Versuche über Nitrifikation und Wasserstoffionenkonzentration. — Bergens Mus. Aarbok. Nat. R. Nr. *6*.

Gollmick, F. 1936. Der Einfluss von Zink, Eisen, Kupfer und deren Kombination auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. — Zentralbl. Bakt. Abt. II, *93*: 421–442.

Grosskopf, W. 1935. Stoffliche und morphologische Untersuchungen forstlich-ungünstiger Humusformen. — Thar. Forstl. Jahrb. *86*: 48–111.

György, P. 1937. Attempts to isolate the anti-egg injury factor (vitamin H). — Journ. Biol. Chem. *119*: xliii xliv.

György, P., Rose, C. S., Hofman, K., Melville, D. B. & du Vigneaud, V. 1940. A further note on the identity of vitamin H with biotin. — Science *92*: 609.

Hagem, O. 1910. Untersuchungen über norwegische Mucorineen II. — Vidensk.-Selsk. Skrift. I. Math.-Naturv. Kl. No. *4*.

Hartelius, V. & Nielsen, N. 1938. Ausschüttelung des Faktors Z und der Bios-Wuchsstoffe durch Hefe. — Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. *22*: 281–286.

Hasselt, W. van. 1935. Onderzoekingen over het bios-vraagstuk. — Diss. Utrecht

Hawker, L. E. 1938. Effect of growth substances on growth and fruiting of *Melanospora destruens*. — Nature *142*: 1038.

—— 1939. The nature of the accessory growth factors influencing growth and fruiting of *Melanospora destruens* Shear. and of some other fungi. — Ann. Bot., N. S. *3*: 657–675.

Helbig, M. & Jung, E. 1929. Experimentelle Untersuchungen über Waldstreuzersetzung. — Allg. Forst- u. Jagd-Zeit. *105*: 336–353, 382 392.

Hesselman, H. 1926. Studier över barrskogens humustäcke, dess egenskaper och beroende av skogsvården. (Deutsche Zusammenf.) — Medd. Stat. skogsförs.-anst. *22*: 169–552. Stockholm.

Hills, G. M. 1938. Aneurin (Vitamin B_1) and pyruvate metabolism by *Staphylococcus aureus*. — Biochem. Journ. *32*: 383–391.

Holländer, S. 1932. Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Wurzelpilzen saprophytisch lebender Orchideen. — Diss. Würzburg.

Holmberg, B. 1930. Die Mercaptolyse des Fichtenholzes. — Ing. Vet. Akad. Handl. *103*. Stockholm.

—— 1934. Thioglykolsäure als Ligninreagens. — Ing. Vet. Akad. Handl. *131*. Stockholm.

—— 1936. Lignin-Untersuchungen XI. Fichtenholz und Mercapto-säuren. — Ber. Deutsch. Chem. Ges. *69*: 115–119.

Holmberg, B. & Gralén, N. 1942. Die Stöchiometrie des Fichtenlignins. — Ing. Vet. Akad. Handl. *162*. Stockholm.

Hopkins, E. F. 1922. Hydrogen-ion concentration in its relation to wheat scab. — Amer. Journ. Bot. *9*: 159–179.

Iterson, C. van. 1904. Die Zersetzung von Cellulose durch aërobe Mikroorganismen. — Centralbl. Bakt. Abt. II, *11*: 689–698.

Jacquot, R. 1938. La production d'acide oxalique par diverses moisissures. Influence du pH. — Compt. Rend. Soc. Biol. Paris *127*: 1431–1432.

Jayme, G. & Sarten, P. 1941. Über die quantitative Bestimmung von Furfurol, Pentosen und Pentosanen. II. — Biochem. Zeitschr. *310*: 1–27.

Karström, H. 1930. Über die Enzymbildung in Bakterien und über einige physiologische Eigenschaften der untersuchten Bakterienarten. — Diss., Helsingfors.

—— 1938. Enzymatische Adaption bei Mikroorganismen. — Ergebn. Enzymforschung *7*: 350–376.

Klason, P. 1908. Verein der Zellstoff- und Papier-Chemiker, Hauptversammlung 1908: 53. Berlin 1909.

Kleberg, T. 1927. Zersetzungsvorgänge im Waldhumus. — Landw. Jahrb. *66*: 317–360.

KLOTZ, L. J. 1923. Studies in the physiology of the fungi. XVI. Some aspects of nitrogen metabolism in fungi. — Ann. Missouri Bot. Gard. *10*: 299–368.

KLUYVER, A. J. 1914. Biochemische suikerbepalingen. — Diss., Delft.

KNIEP, H. 1928. Die Sexualität der niederen Pflanzen. Jena.

KNIGHT, B. C. J. G. 1936. Bacterial nutrition. Material for a comparative physiology of bacteria. — Med. Res. Council, Spec. rep. ser. *210*. London.

—— 1937. The nutrition of *Staphylococcus aureus*. The activities of nicotinamide, aneurin (vitamin B_1) and related compounds. — Biochem. Journ. *31*: 966–973.

KOCH, A. 1914. Über die Einwirkung des Laub- und Nadelwaldes auf den Boden und die ihn bewohnenden Pflanzen. — Centralbl. Bakt. Abt. II, *41*: 545–572.

KÖGL, F. 1935. Über Wuchsstoffe der Auxin- und der Bios-Gruppe. — Ber. Deutsch. Chem. Ges. *68* A: 16–28.

—— 1937. Wirkstoffprinzip und Pflanzenwachstum. — Naturwiss. *25*: 465–470.

KÖGL, F. & FRIES, N. 1937. Über den Einfluss von Biotin, Aneurin und Meso-Inosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. — Zeitschr. physiol. Chemie *249*: 93–110.

KÖGL, F. & TÖNNIS, B. 1936. Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb. — Zeitschr. physiol. Chem. *242*: 43–73.

KÖGL, F. & WAGTENDONK, W. J. VAN. 1938. Über die Bedeutung von Biotin für das Wachstum von *Staphylococcus pyogenes aureus*. — Rec. Trav. chim. Pays-Bas *57*: 747–754.

KOLTHOFF, J. M. & VLEESCHHOUWER, J. J. 1926. Eine neue Reihe Pufferlösungen mit einem p_H zwischen 2,2 und 6,0. — Biochem. Zeitschr. *179*: 410–413.

KONING, C. J. 1904. Contributions à la connaissance de la vie des champignons humicoles et des phénomènes chimiques qui constituent l'humification. — Arch. Néerland. Sci. Exact. et Nat. Sér. II, *9*: 34–107.

KOSTYTSCHEW, S. 1926. Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. I. Berlin.

KULLGREN, C. & TYDÉN, H. 1929. Über die Bestimmung von Pentosanen. — Ing. Vet. Akad. Handl. *94*. Stockholm.

LEDEBOER, M. S. J. 1934. Physiologische onderzoekingen over *Ceratostomella ulmi* (Schwarz) Buisman. — Diss., Baarn.

LEONIAN, L. H. & LILLY, V. G. 1940. Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors influencing the growth of some thiamin-requiring fungi. — Amer. Journ. Bot. *27*: 18–26.

LIEBIG, J. VON. 1855. Die Grundsätze der Agricultur-Chemie. Braunschweig.

LIEBSCHER, G. 1895. Untersuchungen über die Bestimmung des Düngerbedürfnisses der Ackerböden und Kulturpflanzen. — Journ. Landwirtsch. *43*: 49–216.

LINDEBERG, G. 1939 a. Über das Wuchsstoffbedürfnis verschiedener Arten der Pilzgattung *Marasmius*. — Svensk Bot. Tidskr. *33*: 85–90.

—— 1939 b. Über den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum verschiedener *Marasmius*-Arten. — Svensk Bot. Tidskr. *33*: 341–346.

—— 1941. Über die Wirkung von Biotin auf *Marasmius androsaceus* (L.) Fr. — Arch. Mikrobiol. *12*: 58–62.

LINDFORS, TH. 1924. Einige Kulturversuche mit *Fusarium*-Arten in Nährlösungen von verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. — Bot. Notiser *1924*: 161–171.

LINDQUIST, B. 1931. Den skandinaviska bokskogens biologi. (Engl. Zusammenf.) — Sv. Skogsvårdsför. Tidskr. *29*: 175–532.

Lohmann, G. 1934. Nährstoffwirkung und Giftwirkung bei *Aspergillus niger*. — Arch. Mikrobiol. *5*: 31–56.

Lohmann, K. & Schuster, P. 1937. Über die Co-Carboxylase. — Naturwiss. *25*: 26–27.

Lundegårdh, H. 1923. Die Bedeutung des Kohlensäuregehalts und der Wasserstoffionkonzentration des Bodens für die Entstehung der Fusariosen. — Bot. Notiser *1923*: 25–52.

1924. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration in Gegenwart von Salzen auf das Wachstum von *Gibberella Saubinetii*. — Biochem. Zeitschr. *146*: 564–572.

1932. Die Nährstoffaufnahme der Pflanze. Jena.

1940. Investigations as to the absorption and accumulation of inorganic ions. — Lantbrukshögsk. Ann. *8*: 233–404. Uppsala.

Lundin, H. & Ellburg, J. 1929. Schnelle Bestimmung von Stickstoff nach Kjeldahl. — Wochenschr. f. Brauerei *46*: 133.

Lundin, H., Ellburg, J., & Riem, H., 1935. Schnelle Bestimmung von Stickstoff nach Kjeldahl. — Zeitschr. analyt. Chemie *102*: 161–172.

Lwoff, A. 1934. Die Bedeutung des Blutfarbstoffes für die parasitischen Flagellaten. — Zentralbl. Bakt. Abt. I. Orig. *130*: 498–518.

Malm, M. & Lundin, H. 1941. Über die Verwendung von *Phycomyces Blakesleeanus* für die Bestimmung von Vitamin B_1. — Svensk Kem. Tidskr. *53*: 246–264.

Mann, M. L. 1932. Calcium and magnesium requirements of *Aspergillus niger*. — Bull. Torrey Bot. Club *59*: 443–490.

McBeth, I. G. & Scales, F. M. 1913. The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. — U. S. Dept. Agr., Bur. Plant Ind., Bull. *266*.

McIlvaine, T. C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. — Journ. Biol. Chem. *49*: 183–186.

Melin, E. 1923. Experimentelle Untersuchungen über die Konstitution und Ökologie der Mykorrhizen von *Pinus silvestris* L. und *Picea Abies* (L.) Karst. — Mykol. Unters. u. Ber. *2*: 73–340.

1924. Über den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Virulenz der Wurzelpilze von Kiefer und Fichte. — Bot. Notiser *1924*: 38–48.

1925. Untersuchungen über die Bedeutung der Baummykorrhiza. Eine ökologisch-physiologische Studie. Jena.

1930. Biological decomposition of some types of litter from North American forests. — Ecology *11*: 72–101.

1936. Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. — Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. XI: 4.

1943. Betydelsen av vissa tillväxtreglerande ämnen i skogsförna för marksvampar. — Svensk Bot. Tidskr. *37*: 115–117.

1944. Der Einfluss von Waldstreuextrakten auf das Wachstum von Bodenpilzen, mit besonderer Berücksichtigung der Wurzelpilze von Bäumen. — Symb. Bot. Ups. VIII: 3 (im Druck).

Melin, E. & Lindeberg, G. 1939. Über den Einfluss von Aneurin und Biotin auf das Wachstum einiger Mykorrhizenpilze. — Bot. Notiser *1939*: 241–245.

Melin, E. & Norkrans, B. 1942. Über den Einfluss der Pyrimidin- und der Thiazolkomponente des Aneurins auf das Wachstum von Wurzelpilzen. — Svensk Bot. Tidskr. *36*: 271–286.

Melin, E. & Nyman, B. 1940. Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Aneurin und Biotin auf das Wachstum von Wurzelpilzen. — Arch. Mikrobiol. *11*: 318–328.

—— 1941. Über das Wuchsstoffbedürfnis von *Boletus granulatus* (L.) Fr. — Arch. Mikrobiol. *12*: 254–259.

Metz, O. 1930. Über Wachstum und Farbstoffbildung einiger Pilze unter dem Einfluss von Eisen, Zink und Kupfer. — Arch. Mikrobiol. *1*: 197–251.

Mevius, W. 1927. Kalzium-Ion und Wurzelwachstum. — Jahrb. wiss. Bot. *66*: 183–253.

Mitscherlich, E. A. 1921. Das Wirkungsgesetz der Wachstumsfaktoren. — Landw. Jahrb. *56*: 71–92.

Modess, O. 1941. Zur Kenntnis der Mykorrhizabildner von Kiefer und Fichte. — Symb. Bot. Ups. V: 1.

Molisch, H. 1894. Die mineralische Nahrung der niederen Pilze. — Sitzungsber. K. Akad. Wiss. Wien, Math.-Nat. Cl., Abt. I, *103*: 554–574.

Müller, F. W. 1941. Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenpilzes *Mucor Ramannianus*. — Ber. Schweiz. Bot. Ges. *51*: 165–256.

Müller, F. W. & Schopfer, W. H. 1937. L'action de l'aneurine et de ses constituants sur *Mucor Ramannianus* Möll. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *205*: 687–689.

Müller, P. E. 1887. Studien über die natürlichen Humusformen und deren Einwirkung auf Vegetation und Boden. Berlin.

Němec, A. 1927. Sur la teneur de l'humus forestier en résines et son influence sur l'humification des matières organiques. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, *185*: 1154–1155.

Nielsen, N. & Hartelius, V. 1932. Über die Bildung eines Wuchsstoffes (Gruppe B) auf chemischem Wege. — Biochem. Zeitschr. *256*: 2–10.

—— 1933. Untersuchungen über die Wirkung einiger Metalle als Co-Wuchsstoffe. — Biochem. Zeitschr. *259*: 340–350.

—— 1935. Über die Co-Wuchsstoffwirkung einiger Metallmischungen. — Biochem. Zeitschr. *276*: 183–185.

—— 1937. Über die Trennung der auf die Stoffproduktion der Hefe und Schimmelpilze einwirkenden Wuchsstoffe. — Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. *22*: 1–22.

Niethammer, A. 1925. Über das Gesetz vom Minimum bei Pilzkulturen. — Biochem. Zeitschr. *165*: 168–195.

Nikitinsky, J. 1904. Über die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. — Jahrb. wiss. Bot. *40*: 1–93.

Nilsson, R. 1941. Über die Bedeutung der Zellstruktur für den harmonischen Verlauf des Stoffwechsels in der Zelle. — Arch. Mikrobiol. *12*: 63–90.

Nilsson, R., Bjälfve, G. & Burström, D. 1939. Über Zuwachsfaktoren bei *Bact. radicicola*. V. — Lantbrukshögsk. Ann. *7*: 301–331. Uppsala.

Norman, A. G. 1929. The biological decomposition of plant materials. I. The nature and quantity of the furfuraldehyde-yielding substances in straws. — Biochem. Journ. *23*: 1353–1366.

—— 1937. The biochemistry of cellulose, the polyuronides, lignin &c. Oxford.

O'Dwyer, M. H. 1926. The hemicelluloses. IV. The hemicelluloses of beech wood. — Biochem. Journ. *20*: 656–664.

Oparin, A. I. 1937. Richtungseinstellung der Invertasewirkung in der lebenden Pflanzenzelle. — Enzymologia *4*: 13–23.

Osterhout, W. J. V. 1906. On the importance of physiologically balanced solutions for plants. I. Marine plants. — Bot. Gaz. *42*: 127–134.

—— 1907. On the importance of physiologically balanced solutions for plants. II. Fresh-water and terrestrial plants. — Bot. Gaz. *44*: 259–272.

Otto, H. 1916. Untersuchungen über die Auflösung von Zellulosen und Zellwänden durch Pilze. — Diss., Berlin.

Palitzsch, S. 1915. Über die Anwendung von Borax- und Borsäurelösungen bei der colorimetrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers. — Biochem. Zeitschr. *70*: 333–343.

Pfeffer, W. 1895. Ueber Election organischer Nährstoffe. — Jahrb. wiss. Bot. *28*: 205–268.

Pirschle, K. 1938. Die Bedeutung der Spurenelemente für Ernährung, Wachstum und Stoffwechsel der Pflanzen. I. — Ergebn. Biol. *15*: 67–165.

—— 1939. Die Bedeutung der Spurenelemente für Ernährung, Wachstum und Stoffwechsel der Pflanzen. II. — Ergebn. Biol. *17*: 255–413.

Prianischnikow, D. 1923. Zur Frage über die Bedeutung des Calciums für die Pflanzen. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *41*: 138–144.

Pringsheim, E. G. 1914. Über den Einfluss der Nährstoffmenge auf die Entwicklung der Pilze. — Zeitschr. Bot. *6*: 577–624.

Pringsheim, H. & Fuchs, W. 1923. Über den bakteriellen Abbau von Ligninsäure. — Ber. Deutsch. Chem. Ges. *56*: 2095–2097.

Ramberg, L. 1932. Destillationsapparater för framställning av vatten av hög renhetsgrad. — Svensk Kem. Tidskr. *44*: 130–135.

Raulin, J. 1869. Études chimiques sur la végétation. — Ann. Sci. Nat., Sér. V, *11*: 93–299.

Rege, R. D. 1927. Bio-chemical decomposition of cellulosic materials, with special reference to the action of fungi. — Ann. Appl. Biol. *14*: 1–44.

Reitsma, J. 1932. Studien über *Armillaria mellea* (Vahl) Quél. — Phytopath. Zeitschr. *4*: 461–522.

Rennerfelt, E. 1934. Untersuchungen über die Salzaufnahme bei *Aspergillus niger*. — Planta *22*: 221–239.

Richards, H. M. 1897. Die Beeinflussung des Wachsthums einiger Pilze durch chemische Reize. — Jahrb. wiss. Bot. *30*: 665–688.

Ricken, A. 1910–1915. Die Blätterpilze (*Agaricaceae*) Deutschlands und der angrenzenden Länder, besonders Oesterreichs und der Schweiz. Leipzig.

Rippel, A. & Stoess, U. 1932. Ist Calcium ein für Mikroorganismen notwendiges Element? — Arch. Mikrobiol. *3*: 492–506.

Ritter, G. E. 1909. Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *27*: 582–588.

—— 1911. Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *29*: 570–577.

Robak, H. 1933. On the growth of three wood-destroying *Polyporeae* in relation to the hydrogen-ion concentration of the substratum. — Svensk Bot. Tidskr. *27*: 56–76.

—— 1942. Cultural studies in some Norwegian wood-destroying fungi. — Medd. fra Vestlandets Forstl. Forsøksstation, *25*. Bergen.

Robbins, W. J. 1937. The assimilation by plants of various forms of nitrogen. — Amer. Journ. Bot. *24*: 243–250.

—— 1938. Thiamin and growth of species of *Phytophthora*. — Bull. Torrey Bot. Club *65*: 267–276.

—— 1939 a. Growth substances in agar. — Amer. Journ. Bot. *26*: 772–778.

—— 1939 b. Growth substances and gametic reproduction by *Phycomyces*. — Bot. Gaz. *101*: 428–449.

—— 1940. Effect of extracts of *Phycomyces* upon its development. — Amer. Journ. Bot. *27*: 559–564.

Robbins, W. J. & Hamner, K. C. 1940. Effect of potato extracts on growth of *Phycomyces*. — Bot. Gaz. *101*: 912–927.

Robbins, W. J. & Kavanagh, F. 1937. Intermediates of vitamin B_1 and growth of *Phycomyces*. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. *23*: 499–502.

—— 1938. Thiamin and growth of *Pythium Butleri*. — Bull. Torrey Bot. Club. *65*: 453—461.

Robbins, W. J. & Ma, R. 1941. Biotin and the growth of *Fusarium avenaceum*. — Bull. Torrey Bot. Club. *68*: 446–462.

Roberg, M. 1928. Über die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen auf Aspergillen. — Centralbl. Bakt. Abt. II, *74*: 333–370.

—— 1931. Weitere Untersuchungen über die Bedeutung des Zinks für *Aspergillus niger*. — Zentralbl. Bakt. Abt. II, *84*: 196–230.

Romell, L.-G. 1926. Über das Zusammenwirken der Produktionsfaktoren. — Jahrb. wiss. Bot. *65*: 739–777.

—— 1934. Den lagrade energiens omsättning och dess biologi. — Skottsberg, C., Växternas liv *2*: 1–112. Stockholm.

—— 1939. Barrskogens marksvampar och deras roll i skogens liv. (Engl. Zusammenf.) — Sv. Skogsvårdsför. Tidskr. *37*: 348—375.

Rubinstein, D. L. 1928. Das Problem des physiologischen Ionenantagonismus. — Protoplasma *4*: 259–314.

Russel, E. J. 1936. Boden und Pflanze. 2. Aufl. Dresden und Leipzig.

Sakamura, T. 1924. Über die Kultur von *Aspergillus niger* mit besonderer Rücksicht auf das Puffervermögen der Nährlösung. — Journ. Coll. Agr. Hokkaido Imp. Univ. *14*: 65–128.

—— 1927. Weitere Studien über die moderierende Rolle der organischen Salze und des Phosphats bei der Kultur von *Aspergillus niger*. — Jap. Journ. Bot. *3*: 245–265.

Scales, F. M. 1915. Some filamentous fungi tested for cellulose destroying power. — Bot. Gaz. *60*: 149–153.

Schopfer, W. H. 1934 a. Versuche über die Wirkung von reinen kristallisierten Vitaminen B auf *Phycomyces*. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. *52*: 308–312.

—— 1934 b. Les vitamines cristallisées B comme hormones de croissance chez un microorganisme (*Phycomyces*). — Arch. Mikrobiol. *5*: 511–549.

—— 1935 a. Recherches sur l'utilisation des facteurs de croissance par un microorganisme. La synthèse biologique des facteurs de croissance. — Arch. Mikrobiol. *6*: 196–207.

—— 1935 b. Vitamines et facteurs de croissance chez les plantes. Contribution à l'étude quantitative des conditions d'action des facteurs de croissance sur *Phycomyces*. — Arch. Mikrobiol. *6*: 510–531.

Schopfer, W. H. 1936. Recherches sur l'adsorbtion et l'élution de la vitamine B_1. — Compt. Rend. Soc. phys. hist. nat. Genève *53*: 6–10.

—— 1937 a. Recherches sur le métabolisme de l'azote d'un microorganisme acellulaire (*Phycomyces Blakesleeanus* Bgt.). Le rôle des facteurs de croissance. — Protoplasma *28*: 381–434.

—— 1937 b. L'action des constituants de l'aneurine sur des levûres (*Rhodotorula rubra* et *flava*). — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *205*: 445–447.

— 1937 c. L'aneurine et ses constituants, facteurs de croissance de Mucorinées (*Parasitella*, *Absidia*) et de quelques espèces de *Rhodotorula*. — Compt. Rend. Soc. Biol. Paris *126*: 842.

1938 a. Aneurine et hétérotrophie chez les microorganismes. — Arch. Mikrobiol. *9*: 116–128.

—— 1938 b. La pyrimidine (2-méthyl-4-amino-5-amino-méthyl-pyrimidine), facteur de croissance de microorganismes (*Rhodotorula*, Mucorinées, *Dematium*). — Protoplasma *31*: 105–135.

—— 1939. Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B_1. — Ergebn. Biol. *16*: 1–172.

Schopfer, W. H. & Blumer, S. 1940. Recherches sur la répartition de l'hétérotrophie par rapport à l'aneurine chez les champignons. — Arch. Mikrobiol. *11*: 205–214.

—— 1943. Zur Wirkstoffphysiologie von *Trichophyton album* Sab. — Ber. Schweiz. Bot. Ges. *53*: 409–456.

Schopfer, W. H. & Jung, A. 1937. L'action des produits de désintégration de l'aneurine sur *Phycomyces*. Le second facteur de croissance des Mucorinées. — Compt. Rend. Acad. Sci. Paris *204*: 1500–1501.

Schropp, W. & Scharrer, K. 1933. Wasserkulturversuche mit der „A–Z-Lösung" nach Hoagland. — Jahrb. wiss. Bot. *78*: 544–563.

Schwalbe, H. 1925. Eine neue Methode zur Bestimmung des Lignins. — Der Papier-Fabrikant *23*: 174–177.

Semb, G. 1936. Soppringer og deres innflytelse på jorden og planteveksten. — Jordundersokelsenes småskrift *24*. Oslo.

Sinclair, H. M. 1937. Growth factors for *Phycomyces*. — Nature *140*: 361.

Söhngen, N. L. & Coolhaas, C. 1924. The fermentation of galactose by *Saccharomyces cerevisiae*. — Journ. Bact. *9*: 131–141.

—— 1926. Die Galaktosegärung durch *Saccharomyces cerevisiae*. — Centralbl. Bakt. Abt. II, *66*: 5–11.

Sörensen, S. P. L. 1909. Enzymstudien. II. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. — Biochem. Zeitschr. *21*: 131–304.

Steinberg, R. A. 1919. A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger*. — Amer. Journ. Bot. *6*: 330–372.

—— 1935 a. The nutritional requirements of the fungus *Aspergillus niger*. — Bull. Torrey Bot. Club. *62*: 81–90.

— 1935 b. Nutrient-solution purification for removal of heavy metals in deficiency investigations with *Aspergillus niger*. — Journ. Agric. Res. *51*: 413–424.

Tamiya, H. 1928. Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae*. II. — Acta Phytochimica *4*: 77–213.

Treschow, C. 1938. Undersogelser over Brintjonkoncentrationens Indflydelse paa Væksten af Svampen *Polyporus annosus*. (Deutsche Zusammenf.) — Det Forstlige Forsogsvæsen i Danmark *5*: 17–32.

Treschow, C. 1943. Die Bedeutung der Wuchsstoffe für *Psalliota hortensis*. — Naturwiss. *31*: 210.

Twort, F. W. & Ingram, G. L. Y. 1913. A monograph on Johne's disease. London (Baillière, Tindall & Cox). (Zit. nach Schopfer 1939.)

Wagtendonk, W. J. van. 1937. Een onderzoek naar de groeifactoren van *Staphylococcus aureus*. — Diss., Utrecht.

Waksman, S. A. 1927. Principles of soil microbiology. Baltimore.

—— 1931. Decomposition of the various chemical constituents etc. of complex plant materials by pure cultures of fungi and bacteria. — Arch. Mikrobiol. *2*: 136–154.

—— 1936. Humus. Origin, chemical composition, and importance in nature. London.

Waksman, S. A. & Hutchings, I. J. 1936. Decomposition of lignin by microorganisms. — Soil Science *42*: 119–130.

Waksman, S. A. & McGrath, J. M. 1931. Preliminary study of chemical processes involved in the decomposition of manure by *Agaricus campestris*. — Amer. Journ. Bot. *18*: 573–581.

Waksman, S. A. & Tenney, F. G. 1927/28. Composition of natural organic materials and their decomposition in the soil. I–III. — Soil Science *24*: 275–283, 317–333; *26*: 155–171.

Valentine, F. C. O. & Rivers, T. M. 1927. Further observations concerning growth requirements of hemophilic bacilli. — Journ. Exper. Med. *45*: 993–1002.

Waris, H. 1939. Über den Antagonismus von Wasserstoffionen und Metallkationen bei *Micrasterias*. — Acta Bot. Fennica *24*.

Webb, R. W. 1919. Studies in the physiology of the fungi. X. Germination of the spores of certain fungi in relation to hydrogen-ion concentration. — Ann. Missouri Bot. Gard. *6*: 201–222.

—— 1921. Studies in the physiology of the fungi. XV. Germination of the spores of certain fungi in relation to hydrogen-ion concentration. — Ann. Missouri Bot. Gard. *8*: 283–341.

Weir, J. R. 1911. Benötigt der Pilz *Coprinus* Kalksalze zu seinen physiologischen Funktionen? — Flora *103*: 87–90.

Vigneaud, V. du, Melville, D. B., György, P. & Rose, C. S. 1940. On the identity of vitamin H with biotin. — Science *92*: 62–63.

Wildiers, E. 1901. Nouvelle substance indispensable au développement de la levûre. — La Cellule *18*: 311–333.

Wilkins, W. H., Harley, J. L. & Kent, G. C. 1938. The ecology of the larger fungi. II. The distribution of the larger fungi in part of Charlton forest, Sussex. — Ann. Appl. Biol. *25*: 472–489.

Willstätter, R. & Zechmeister, L. 1913. Zur Kenntnis der Hydrolyse von Cellulose. I. — Ber. Deutsch. Chem. Ges. *46*: 2401–2412.

Vogel, H. 1943. Chemie und Technik der Vitamine. 2. Aufl. Stuttgart.

Wollny, E. 1897. Die Zersetzung der organischen Stoffe und die Humusbildungen mit Rücksicht auf die Bodencultur. Heidelberg.

Wolpert, F. S. 1924. Studies in the physiology of the fungi. XVII. The growth of certain wood-destroying fungi in relation to the H-ion concentration of the media. — Ann. Missouri Bot. Gard. *11*: 43–97.

Zeller, S. M., Schmitz, H. & Duggar, B. M. 1919. Studies in the physiology of the fungi. VII. Growth of wood-destroying fungi on liquid media. — Ann. Missouri Bot. Gard. *6*: 137–142.

SYMBOLAE BOTANICAE UPSALIENSES:

VOL. I. (N:r 1—5.)

1. H. G. Bruun, Cytological Studies in Primula. Uppsala 1932. Pris 12 kr.
2. Ragnhild Grundell, Zur Anatomie von Myrothamnus flabellifolia Welw. Uppsala 1933. Pris 1: 50 kr.
3. J. A. Nannfeldt, Poa rigens Hartm. versus Poa arctica R. Br. Uppsala 1934. Pris 2 kr.
4. Sven Junell, Zur Gynäceummorphologie und Systematik der Verbenaceen und Labiaten nebst Bemerkungen über ihre Samenentwicklung. Uppsala 1934. Pris 12 kr.
5. J. A. Nannfeldt, Taxonomical and Plant-geographical Studies in the Poa laxa Group. A Contribution to the History of the North European Mountain Floras. Uppsala 1935. Pris 6 kr.

VOL. II.

1. H. O. Juel, Joachim Burser's Hortus siccus. Uppsala 1936. Pris 10 kr.
2. Nils Svedelius, The Apomeiotic Tetrad Division in Lomentaria rosea in Comparison with the Normal Development in Lomentaria clavellosa. Uppsala 1937. Pris 3 kr.
3. G. B. E. Hasselberg, Zur Morphologie des vegetativen Sprosses der Loganiaceen. Uppsala 1937. Pris 9 kr.
4. George F. Papenfuss, The Structure and Reproduction of Claudea multifida, Vanvoorstia spectabilis, and Vanvoorstia coccinea. Uppsala 1937. Pris 4 kr.

VOL. III.

1. Gunnar Lohammar, Wasserchemie und höhere Vegetation schwedischer Seen. Uppsala 1938. Pris 15 kr.
2. Nils Fries, Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. Uppsala 1938. Pris 10 kr.
3. Daniel Lihnell, Untersuchungen über die Mykorrhizen und die Wurzelpilze von Juniperus communis. Uppsala 1939. Pris 7 kr.

VOL. IV.

1. Nils Fries, Researches into the Multipolar Sexuality of Cyathus striatus Pers. Uppsala 1940. Pris 3 kr.
2. Ewert Åberg, The Taxonomy and Phylogeny of Hordeum L. sect. Cerealia Ands. with special reference to Thibetan Barleys. Uppsala 1940. Pris 9 kr.
3. George F. Papenfuss, A Revision of the South African Marine Algae in Herbarium Thunberg. Uppsala 1940. Pris 2 kr.
4. J. A. Nannfeldt, On the Polymorphy of Poa arctica R. Br., with Special Reference to its Scandinavian Forms. Uppsala 1940. Pris 6 kr.
5. Börje Åberg, Växtodling i artificiellt ljus (konstljuskultur) med särskild hänsyn till tomat. (Pflanzenkultur bei künstlichem Licht [Kunstlichtkultur] mit besondrer Berücksichtigung der Tomate.) Uppsala 1941. Pris 6 kr.

VOL. V.

1. Oskar Modess, Zur Kenntnis der Mykorrhizabildner von Kiefer und Fichte. Uppsala 1941. Pris 7 kr.
2. Daniel Lihnell, Cenococcum graniforme als Mykorrhizabildner von Waldbäumen. Uppsala 1942. Pris 2 kr.

3. Börje Åberg und Wilhelm Rodhe, Über die Milieufaktoren in einigen südschwedischen Seen. Uppsala 1942. Pris 15 kr.
4. Daniel Lihnell, Tetramyxa rhizophaga Lihnell n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von Juniperus communis L. Uppsala 1942. Pris 1: 50 kr.

VOL. VI.

1. Gunnar Israelson, The Freshwater Florideae of Sweden. Studies on their Taxonomy Ecology, and Distribution. Uppsala 1942. Pris 7 kr.
2. Erik Björkman, Über die Bedingungen der Mykorrhizabildung bei Kiefer und Fichte. Uppsala 1942. Pris 10 kr.
3. Daniel Lihnell, Keimungsversuche mit Pyrolasamen. Uppsala 1942. Pris 3 kr.
4. Nils Fries, Untersuchungen über Sporenkeimung und Mycelentwicklung bodenbewohnender Hymenomyceten. Uppsala 1943. Pris 5 kr.

VOL. VII.

1. Nils Hylander, Die Grassameneinkömmlinge schwedischer Parke mit besonderer Berücksichtigung der Hieracia silvaticiformia. Uppsala 1943. Pris 20 kr.
2. Nils Fries, Die Einwirkung von Adermin, Aneurin und Biotin auf das Wachstum einiger Ascomyceten. Uppsala 1943. Pris 5 kr.

VOL. VIII.

1. Börje Åberg, Physiologische und ökologische Studien über die pflanzliche Photomorphose. Uppsala 1943. Pris 10 kr.
2. Gösta Lindeberg, Über die Physiologie ligninabbauender Bodenhymenomyzeten. Uppsala 1944. Pris 10 kr.

Pris 10 kr.

Uppsala 1944. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB 43761